



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

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

Résumés non techniques des projets autorisés (31)

3101. La transformation cellulaire est un phénomène complexe. Elle est contrôlée par des mécanismes de contrôle/défense cellulaires autonomes et non cellulaires autonomes. Notre projet se situe dans le cadre de l'étude de l'implication de protéines kinases dans la transformation cellulaire. Nous utilisons des systèmes d'études *in vitro* pour identifier et étudier les mécanismes d'action des gènes/protéines qui sont impliqués dans la prolifération cellulaire. Cependant, ces méthodes alternatives restent incomplètes pour l'étude de phénomènes physiologiques aussi complexes que la formation d'une tumeur, puisqu'elles ne tiennent pas compte des interactions des cellules cancéreuses avec leur environnement tissulaire dans un organisme complexe. Dans nos projets de recherche, largement dépendants d'études moléculaires et d'études de cellules en culture, nous avons la nécessité de tester nos hypothèses *in vivo*. L'objectif du projet est de tester dans un modèle animal, l'hypothèse d'une fonction de ces gènes dans l'apparition de tumeurs ou dans la progression du phénotype transformé de cellules. Cette étape chez l'animal est fondamentale pour valider des hypothèses élaborées à partir des expériences de substitution réalisées *in vitro*.

Pour notre projet, nous utiliserons uniquement des souris. Il s'agira soit d'animaux génétiquement modifiés (souris knock out), soit des souris qui seront transplantées avec des cellules d'intérêt modifiées. Dans le premier cas, nos études seront des études complètes d'analyse de phénotypes, dans le deuxième cas, les expériences sur des animaux viendront en complément d'expériences avec des méthodes alternatives (étude de cellules en culture) afin de réduire le nombre de souris en expérimentation.

L'hébergement des animaux est effectué en confinement adapté à la stabulation de lignées de souris (Cages individuellement ventilées: sealseafe plus TECHNIPLAST) et les animaux sont manipulés en condition stérile. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies *ad libitum*. Les conditions d'hébergement ont été optimisées pour réduire le stress des animaux : présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et maintien des animaux en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement.

Notre projet intègre les notions et exigences de remplacement, réduction et raffinement. Remplacement : dans nos projets de recherche nous utilisons essentiellement des modèles *in vitro* ; nous ne faisons appel aux modèles animaux qu'en complément pour valider des hypothèses. Réduction : nous proposons la réalisation d'expériences pilotes dont un des buts sera de déterminer le nombre minimal d'animaux à utiliser dans les expériences complètes.. Raffinement : les méthodologies utilisées et les points limites des expériences sont validés par le comité local du bien être animal en concertation avec les responsables de l'animalerie.

Le nombre total d'animaux utilisé pour ce projet est de 492 souris. Ce nombre est justifié par l'utilisation de 8 lignées de souris différentes dans notre projet et des trois procédures utilisées.

3102. Notre intérêt porte sur les mécanismes qui contrôlent la formation du corps des vertébrés au cours de l'embryogenèse. En particulier, nous avons focalisé nos efforts sur le processus d'élongation axiale et de segmentation, par laquelle une série périodique de structures anatomiques, telles que les vertèbres, sont formées au cours de l'organogenèse. Notre travail s'appuie sur des études de biologie du développement sur des embryons de poulet, de souris et de poisson-zèbre, en combinant des approches génétiques avec des stratégies génomiques, comme la transcriptomique ou le séquençage à haut débit et la bioinformatique, ainsi que des méthodes très élaborées d'imagerie *in vivo*.

Notre but est de comprendre les principes de base qui sous-tendent ces processus morphogénétiques. Nous collaborons activement avec des physiciens et des mathématiciens pour tenter de modéliser ces processus moléculaires et cellulaires complexes dans l'embryon. De même, nous nous intéressons à la pertinence clinique de ces résultats, et nous explorons la base moléculaire des défauts de formation de la colonne, telle que la scoliose chez l'humain. Enfin, nous abordons le champ de la médecine régénérative, traduisant notre compréhension de la différenciation des cellules des lignées musculaires et vertébrales en stratégies *in vitro* pour différencier des cellules d'embryons murines et humaines ou des cellules souches reprogrammées pour des thérapies cellulaires des maladies dégénératives, comme la dystrophie musculaire de Duchenne.

Remplacement : Pour ce projet nous utiliserons des embryons de souris qui seront prélevés à différents stades du développement. La souris est un modèle standard de génétique moléculaire et de développement embryonnaire. Il n'y a pas à ce jour de modèles non animaux permettant de recréer la complexité des interactions tissulaires, temporelles et spatiales du développement embryonnaire en général.

Nous utilisons l'espèce *Mus musculus*, car c'est la seule espèce connue à ce jour chez laquelle les techniques de recombinaison homologue et de transgénése sont au point et pour laquelle on obtient des lignées mutées stables. De plus, la souris est le seul animal dans lequel il est possible d'inactiver des gènes dans les tissus somatiques adultes. La souris étant un mammifère, sa physiopathologie est proche de celle de l'Homme.

Réduction : Le nombre d'animaux nécessaire varie en fonction de la lignée considérée et de son taux de reproduction. Toutes lignées confondues (nous en avons environ 70), nous estimons notre besoin à 500 souris gestantes par année. Conscients qu'il s'agit d'un nombre conséquent d'animaux utilisés par année, nous allons tester un système de diagnostic précoce de la gestation afin de le réduire au maximum.

Raffinement : aucun dommage n'est attendu au cours de ce projet. Les animaux feront pendant l'objet d'un suivi quotidien afin de prendre les mesures évitant toute souffrance éventuelle.

3103. La mise en place des réseaux de neurones qui vont contrôler les fonctions cérébrales se fait au cours du développement embryonnaire par l'intermédiaire d'une activation progressive de gènes. La connaissance de la temporalité de cette activation va permettre de comprendre comment ce réseau s'est construit et comment une défaillance dans cette construction interviendra dans le dysfonctionnement du cerveau. Notre groupe travaille sur la mise en place du réseau neuronal qui gouverne la fonction respiratoire. Dans le tronc cérébral plusieurs groupes de neurones communiquent entre eux pour assurer une bonne coordination de la respiration. Nous avons déjà mis en avant l'importance de certains gènes de développement dans cette construction. Actuellement nous voulons étudier la dynamique d'un autre gène dont l'absence pendant le développement entraîne la mort à la naissance.

Pour cette étude, il est indispensable de travailler sur des animaux afin de pouvoir suivre le développement du système nerveux. La souris est un modèle adéquat pour les études des conséquences de modifications de gènes. Nous allons utiliser 560 souris ayant subi des modifications génétiques. La plupart d'entre elles sont déjà élevées à l'animalerie et ne présentent pas de déficit dommageable. Elles sont élevées en cages de 6 souris maximum en présence d'accessoires d'enrichissement du milieu adaptés à la souris. Notre étude comporte 2 aspects : un aspect anatomique concernant l'apparition du gène et sa localisation au cours du développement de l'embryon. Différents stades embryonnaires seront étudiés : 10 jours, 12 jours, 15 jours et 18 jours après fécondation, correspondant à des périodes cruciales dans la mise en place du système respiratoire central. Afin d'identifier les neurones en fonction des gènes déjà connus, nous ferons des doubles marquages pour caractériser les types neuronaux concernés. En fonction de ces résultats, dans notre deuxième étude, cinq lignées de souris au maximum seront créées où notre gène d'intérêt sera inactivé spécifiquement dans les neurones qui expriment également les autres gènes identifiés. Le nombre de souris utilisées pourra être réduit en fonction des résultats anatomiques obtenus (raffinement) : seuls les gènes présents dans les mêmes neurones que notre gène d'intérêt seront étudiés. Dans le but de réduire le nombre d'animaux également, les animaux porteurs de combinaisons génétiques n'entraînant pas de déficit respiratoire, pourront être réutilisés en élevage pour donner naissance à de nouveaux animaux. La respiration des souris issues de ces croisements sera étudiée d'une manière non invasive : elles seront d'une part nées par césarienne à E18 pour les prendre en charge dans les meilleures conditions possibles puis rapidement placées individuellement dans une enceinte close pour mesurer la respiration pendant 5 min. On prendra la précaution de commencer par les souris qui présentent des signes de déficit respiratoire. A la fin de l'enregistrement, elles seront vite euthanasiées pour les enregistrer *in vitro* en prélevant le tronc cérébral. Ces études *in vitro* permettront d'étudier les réponses pharmacologiques de ces mutants à plusieurs traitements. Cette étude comportera des petits groupes animaux (n=10) pour pouvoir faire des tests statistiques validant les résultats.

La compréhension des mécanismes vitaux qui contrôlent le rythme respiratoire et du déterminisme génétique qui les soutient pourrait à l'avenir permettre d'élucider certains cas de morts subites du nourrisson et de proposer, le cas échéant, des pistes pour les prévenir.

3104. Le projet " Focus chirurgie rachidienne" a pour but la formation des chirurgiens sur l'utilisation de dispositifs hémostatiques utilisés lors de la chirurgie rachidienne de l'humain. Pour ce faire nous utilisons le modèle porcin pour des raisons de ressemblances anatomiques avec l'humain.

REDUIRE:

Nous utilisons au maximum 4 porcelets (1 porcelet pour 4 chirurgiens)/an soit 20 pour 5 ans. Ce chiffre peut être révisé à la baisse et seulement à la baisse, en fonction du nombre de participants à cette formation. Nous limitons au strict nécessaire le nombre de porcelets.

REPLACER:

Nous ne pouvons pas pour l'instant remplacer cette formation par des techniques *in vitro* ou *in silico*.

RAFFINER:

Les porcelets proviennent d'un élevage agréé.

Les porcelets sont manipulés avec douceur et calme de façon à limiter au maximum le stress. Ils sont prémédiqués avant l'anesthésie générale pour limiter le stress des manipulations.

Avant l'intervention, nous posons une voie veineuse pour l'injection de substances médicamenteuses. Quand l'animal est sous anesthésie générale, nous lui posons une sonde trachéale pour son confort respiratoire.

Avant le début de l'intervention, les constantes (rythme cardiaque et température) de l'animal sont notées comme valeurs de références.

Pendant l'intervention, la profondeur de l'anesthésie et les constantes de l'animal sont surveillés de façon constante.

En cas de variation de ces constantes, des injections médicamenteuses sont effectuées.

C'est une procédure sans réveil. L'animal est euthanasié, sous anesthésie générale, en fin d'intervention par injection de Pentobarbital sodique.

3105. Ce projet vise à évaluer l'influence de l'apport alimentaire (quantité et forme d'apport) en méthionine, acide aminé essentiel, sur la croissance et la composition corporelle ainsi que sur la fonctionnalité du système digestif et le métabolisme des poulets. L'utilisation des acides aminés de synthèse (comme la méthionine) permet de réduire l'apport de protéines dans l'aliment des animaux, d'améliorer l'équilibre alimentaire et donc de diminuer les rejets d'azote dans l'environnement. Les recommandations nutritionnelles en acides aminés sont basées sur la croissance maximale. Cette variable seule ne permet pas de prendre en compte la diversité des réponses de l'animal à un apport en acides aminés. Dans une étude précédente, nous avons montré par exemple qu'une carence modérée en méthionine n'affectant pas la croissance modifie à la fois la teneur en protéines et en lipides et la composition en acides aminés dans certains tissus ou compartiments corporels. Ceci suggère une modification de la nature des protéines déposées dans le muscle qui pourrait influencer la qualité de la viande. La présente expérience propose d'approfondir les connaissances sur le rôle fonctionnel de la méthionine en examinant tout particulièrement la physiologie digestive et la mise en place des systèmes antioxydants. Tout au long de l'expérimentation, l'application de la règle des 3R sera considérée:

- Remplacer : Ce type d'analyse nécessite l'utilisation d'animaux puisqu'à l'heure actuelle, aucun modèle in vitro n'est capable de représenter la complexité des mécanismes physiologiques de digestion et de métabolisme.

- Réduire : Un total de 200 animaux élevés en cages est prévu pour l'étude. Ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour pouvoir tirer des conclusions significatives en tenant compte de nos expériences précédentes et de la variabilité interindividuelle attendue pour les mesures zootechniques (7 traitements intégrant des variations sur la quantité et la forme d'apport en méthionine) et de la réalisation d'abattages et prélèvements à 2 âges. Nous réaliserons des prises de sang et des prélèvements tissulaires sur un total de 80 poulets, en réduisant respectivement le nombre d'animaux prélevés à 10 poulets par âge et par traitement, ceci sur 4 des traitements.

- Raffiner : Pendant la première semaine, les animaux seront 2-3 par cage afin de limiter l'isolement. Ensuite ils seront élevés en cage individuelle afin de pouvoir enregistrer leur consommation d'aliment. Par ailleurs, malgré des apports variables en méthionine dans l'aliment, nous resterons dans une gamme acceptable ne portant pas préjudice aux animaux. Les cages individuelles sont grillagées permettant un contact visuel et olfactif avec les congénères, le sol des cages est adapté au poids des animaux et les cages sont équipées de jouets suspendus à picorer.

3106. Comprendre comment les informations nutritionnelles interfèrent avec la fonction de reproduction est une question majeure, à la fois sur le plan scientifique et le plan sociétal. Dans nos pays industrialisés où la prévalence de l'obésité est en constante augmentation, les anomalies de la fonction de reproduction associées à l'obésité, qui vont depuis des troubles de l'ovulation jusqu'à des complications maternelles sévères de la grossesse, font l'objet d'une attention particulière.

Le contrôle endocrine des gonades (ovaire et testicule) est rapidement affecté en situation de sous-alimentation et aussi de suralimentation. Ce contrôle dépend de deux hormones, LH et FSH, synthétisées par les cellules gonadotropes de l'hypophyse. Actuellement, un nombre croissant de travaux identifie les nutriments comme des molécules actives, capables de recruter directement ou indirectement différentes voies de signalisation. Les acides gras (AG) participent ainsi à la régulation du métabolisme énergétique en agissant sur plusieurs organes du métabolisme mais aussi sur le cerveau. La dérégulation du «lipid sensing» (perception des AG) contribue à plusieurs pathologies et en particulier à l'obésité. Récemment, a été démontré un effet direct des AG insaturés sur la fonction gonadotrope hypophysaire révélant l'existence d'un «lipid sensing» hypophysaire et démontrant que les AG sont capables d'agir sur le contrôle endocrine de la fonction de reproduction.

Par ailleurs, il est maintenant bien connu que les taux sanguins de certaines adipokines, facteurs sécrétés par le tissu adipeux, est altéré en fonction de l'indice de masse corporelle et l'équilibre en adipokines s'avère être un facteur clé dans la physiopathologie de l'obésité et aussi de la reproduction.

Dans ce contexte, notre objectif est d'évaluer les effets et les mécanismes d'action à la fois des acides gras et des adipokines sur l'activité des cellules gonadotropes hypophysaires.

Dans son ensemble, ce projet permettra de mieux comprendre les pathologies de la reproduction associées à l'hyperlipidémie et l'obésité.

Nos différents tests expérimentaux sont dans un premier temps effectués sur des cultures de cellules de la lignée gonadotrope LbetaT2 puis les résultats majeurs sont confirmés sur un modèle plus physiologique : les cellules hypophysaires de rat en culture primaire. Des études in vivo sont également nécessaires et complémentaires pour valider les résultats notamment en induisant une surcharge cérébrale en acides gras ou en adipokine. Nous utiliserons des approches méthodologiques non dommageables pour l'animal avec le souci d'éviter la douleur et d'en réduire le nombre à ce qui est strictement nécessaire pour ce projet. Avec l'exigence d'appliquer les règles de remplacement, réduction et raffinement, un total de 216 rats mâles et un total de 216 rats femelles seront nécessaires pour mener à bien ce projet.

3107. Dans le cadre de la production de spécialités antivenimeuses, l'obtention d'anticorps spécifiques est indispensable. Afin de produire ces anticorps, des chevaux sont immunisés de manière répétée afin d'obtenir une quantité élevée d'anticorps

dans leur sang. L'immunisation est réalisée par des injections d'antigènes constitués de venins et d'adjuvants. A l'issue de la phase d'immunisation, des prélèvements sanguins sont réalisés sur les chevaux. Les animaux peuvent présenter des inflammations locales liées aux injections répétées. Dans de rares cas, des effets secondaires plus importants peuvent être observés. Des mesures vétérinaires sont alors immédiatement mises en place (traitements, arrêt temporaire ou définitif du protocole). 24 chevaux sont concernés pour la durée du projet (2 ans). A la fin du projet les chevaux intègrent, pour leur grande majorité, le circuit d'adoption mis en place par la société et sont replacés en tant que chevaux de loisir. Mise en œuvre des 3R : Remplacement : L'état de la science ne permet pas de fabriquer d'anticorps polyclonaux autrement qu'en ayant recours à l'animal. Dans le cas de certaines maladies, des anticorps monoclonaux peuvent être synthétisés (production industrielle sans animaux) mais les résultats de protection obtenus à ce jour avec de tels anticorps ne sont pas satisfaisants. Il n'existe pas d'anticorps monoclonaux antivenimeux. Réduction : Le nombre d'animaux est proportionnel à la demande de spécialités antivenimeuses mises à la disposition des patients. Le nombre d'animaux utilisé est limité au maximum. Pour ce faire, les globules rouges leur sont restitués en partie, ce qui permet de répéter les prélèvements et d'obtenir des quantités importantes d'anticorps avec le moins d'animaux possible, sans nuire à leur état général. Raffinement : Les chevaux sont hébergés en groupes stables de 15 à 30 individus dans des parcs disposant d'un abri paillé, d'un paddock et d'une pâture. Ils sont observés quotidiennement. Les prélèvements sont réalisés sur des animaux en parfaite santé. Des examens sanguins sont très régulièrement effectués afin de détecter précocement toute éventuelle anémie. En cas de problème de santé, un vétérinaire effectue le suivi clinique et prescrit un traitement. Il peut décider à tout moment de la réforme d'un cheval s'il la juge nécessaire. Dans ce cas, le cheval reçoit les soins prescrits, avant d'intégrer le circuit d'adoption mis en place par la société.

3108. Le but de ce projet est la caractérisation au niveau microscopique des populations cellulaires impliquées dans les processus de dégénération axonale caractéristiques de la sclérose en plaque et leur corrélation aux handicaps moteurs correspondant. Il s'agit de mettre en évidence les cellules responsables de la dégénérescence axonale, et donc des symptômes moteurs, ou bien au contraire les cellules immunitaires protectrices des axones. Ces données serviront à mettre au point des outils de diagnostic précoce et de traitement. Nous espérons être en mesure de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour la prise en charge des patients, afin de combler le manque actuel de traitement réellement efficace. Nous testerons également deux agents thérapeutiques potentiels, dont l'efficacité sera évaluée à la fois grâce aux scores cliniques et aux réactions cellulaires observées.

Ce projet utilise un modèle murin classique de la sclérose en plaque : immunisation de souris contre un peptide de la gaine myélinique des neurones (MOG), ce qui induit une réaction auto-immune contre les axones de la moelle épinière. Ce modèle bien connu de la sclérose en plaque sera combiné avec l'implantation d'une fenêtre spinale, permettant de façon exclusive (seuls quelques rares laboratoires maîtrisent cette technique) la visualisation répétée des axones et des cellules immunitaires dans la moelle épinière d'un même animal, au cours de la pathologie. En effet, des souris transgéniques adultes exprimant différents marqueurs cellulaires fluorescents (Thy1-CFP/LysM-GFP/CD11c-YFP) seront utilisées pour ces expériences permettant la visualisation des cellules d'intérêt sans anticorps ou autre technique de marquage.

Une fois la mise en place et l'évolution de la pathologie caractérisées, l'effet d'agents pharmacologiques sur les cellules immunitaires étudiées et les axones sera suivi au cours du temps, toujours sur les mêmes animaux tout au long de la procédure. Ces données, corrélées aux scores cliniques des animaux le jour-même des enregistrements microscopiques, permettront de déterminer le potentiel thérapeutique des molécules testées aussi bien au niveau cellulaire que physiologique.

Ce projet est conforme aux exigences des 3R:

- Remplacement: ce projet est basé sur de nombreuses études in vitro, qui nous permettent de savoir précisément où chercher et quoi chercher. Cependant, à ce stade des recherches, l'utilisation de modèles complexes, i.e. d'animaux vivants, est requise avant d'envisager une application clinique des agents pharmacologiques.

- Réduction: la fenêtre spinale chirurgicalement implantée aux souris permet l'imagerie d'un même animal tout au long du protocole, ce qui réduit significativement le nombre d'animaux nécessaire, un même animal étant présent à tous les temps étudiés. De plus, seulement le nombre minimal de souris nécessaire à l'obtention d'un résultat statistiquement significatif sera utilisé, soit 3100 animaux en tout dans ce projet, dont 160 soumis aux procédures expérimentales et 2940 nécessaires pour produire le groupe expérimental.

-Raffinement: les seuls dommages escomptés dans ce projet sont les symptômes induits par la sclérose en plaque, c'est-à-dire principalement des troubles moteurs, qui se trouveront chez les animaux. Toutes les mesures possibles permettant d'améliorer les conditions de vie des animaux sont prises. Les animaux sont hébergés dans des cages respectant la surface minimale requise de 330cm<sup>2</sup>, avec un accès non-limité à la nourriture et l'eau, un cycle de 12h jour - 12h nuit, une aération, humidité et température de l'air contrôlées. L'environnement est enrichi de rouleaux en carton et de cotons pour que les animaux puissent se faire un nid. Les animaux sont vérifiés tous les jours, par des personnes compétentes dans le domaine de l'expérimentation animale. La pathologie pouvant amener des difficultés de déplacement aux animaux, de l'agarose sucré à 4% est mis à disposition au fond de la cage pendant la procédure, afin de s'assurer que l'animal a les apports énergétiques dont il a besoin. Les animaux sont d'ailleurs pesés tous les jours. De plus, une anesthésie générale est mise en place avant toute expérimentation, chirurgie ou imagerie, afin de s'assurer de l'absence de stress ou douleur chez l'animal. Des agents anti-inflammatoires sont administrés quotidiennement aux animaux pendant la phase de récupération post-chirurgicale.

3109. Dans le cadre de la recherche sur le cancer et en maladies infectieuses, le développement de vaccins prophylactiques et thérapeutiques et plus largement dans le cadre du développement d'immunothérapies, les études in vitro et les études in

vivo sont deux approches complémentaires. L'objectif de ces thérapies ciblant le système immunitaire est de moduler positivement ou négativement certaines cellules de l'immunité afin de permettre à l'organisme de mieux éliminer les cellules tumorales ou infectées par un pathogène. Les modèles in vitro vont permettre de valider un mode d'action d'une molécule, d'un anticorps, d'un vaccin ou d'une protéine recombinante sur la (ou les) population(s) de cellules immunitaires ciblées. Ces modèles vont être très utiles pour évaluer l'efficacité des composés candidats et définir les types cellulaires ciblés. Ils vont permettre de faire une caractérisation de la mécanistique d'action des composés candidats, de définir des marqueurs d'activité biologique et ainsi de faire une pré-sélection des candidats les plus efficaces qui seront ensuite évalués in vivo. Cette première phase de sélection sur des tests cellulaires in vitro permet de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les études in vivo suivantes. En effet, le développement de modèles in vivo ayant recours aux animaux de laboratoire reste indispensable pour comprendre le mécanisme d'action intégré de ces stratégies d'immunothérapies. Ces modèles in vivo sont également nécessaires pour évaluer l'efficacité thérapeutique de ces stratégies de modulation de la réponse immunitaire sur la croissance tumorale (dans le cadre d'immunothérapie anti-cancéreuse) ou bien sur l'élimination des cellules infectées de l'organisme ou exprimant les antigènes cibles. En immunologie préclinique, les modèles les plus couramment utilisés sont des modèles d'immunomodulation sur des souris immunocompétentes avec implantation ou non de cellules tumorales murines en fonction de l'objectif de l'étude. Ces modèles permettent d'évaluer en parallèle l'immunogénicité (analyses faites ex vivo sur des tissus ou des cellules) et l'efficacité thérapeutique du composé candidat si les animaux sont implantés avec des cellules tumorales. Pour ces modèles in vivo il est également possible d'utiliser des souris génétiquement modifiées qui vont présenter certaines spécificités ou déficiences au niveau du système immunitaire afin de mieux valider les mécanismes d'action des composés candidats. De plus, certaines de ces souris génétiquement modifiées sont hautement immunodéficientes et peuvent recevoir une xélogreffe de cellules hématopoïétiques humaines (cellules souches hématopoïétiques ou cellules hématopoïétiques différenciées) avec l'objectif de reconstituer un système immunitaire humain pour l'évaluation d'immunothérapies in vivo avec des cellules immunitaires ciblées d'origine humaine. Ces modèles permettent de renforcer les données immunologiques et/ou d'efficacité thérapeutique obtenues avant le démarrage des études cliniques chez l'être humain. Dans le cadre d'étude d'immunogénicité sans implantation tumorale, l'apparition de phénomènes douloureux est peu probable, toutefois les animaux seront suivis au niveau clinique et comportemental. L'analyse se fera ex vivo en cinétique post-traitement sur des prélèvements sanguins ou bien en prélèvement terminal après euthanasie de l'animal sur des organes contenant les cellules immunitaires (rate, ganglions lymphatiques, etc.). Pour tous les modèles tumoraux nous avons établi des critères d'arrêt anticipé qui permettent de sacrifier l'animal avant l'apparition de phénomènes douloureux. Des études pilotes permettent de définir la fenêtre d'observation sans dommages critiques pour l'animal. Ce projet nécessitera de recourir à environ 25000 rongeurs (souris et rats) pour le projet. Les études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes et européennes, intégrant tous les aspects garantissant le bien être de l'animal (hébergement, enrichissement, soins, manipulation, expérimentations). Un support en biostatistique est apporté par des experts de la spécialité, afin d'optimiser les méthodes expérimentales, et optimiser le nombre d'animaux utilisés. Les procédures sont réalisées par du personnel qualifié et habilité dans le cadre de la réglementation définie par les dispositions européennes et nationales et formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux.

3110. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est responsable d'une pandémie touchant 35 millions de personnes qui continue de s'étendre avec plus de 2 millions de nouvelles infections chaque année. Un vaccin préventif serait le moyen le plus efficace de diminuer la propagation du virus et d'éliminer la pandémie tandis qu'un vaccin thérapeutique aiderait à contrôler l'évolution de la maladie et à développer des stratégies d'éradication du virus chez les personnes infectées. Toutefois, après 30 ans de recherches, nous ne disposons pas d'un vaccin capable de prévenir l'infection ni de contrôler la progression de la maladie.

Pour identifier des immunogènes et des modalités vaccinales ayant un faible risque d'échec en phase clinique avancée, plusieurs équipes européennes, australiennes, canadiennes et américaines parmi les plus compétitives impliquées dans la recherche vaccinale joignent leurs forces.

L'accent sera mis sur des essais cliniques de petite taille, précoces et rapides pour choisir et améliorer les meilleurs immunogènes, adjuvants, vecteurs vaccinaux et schéma d'immunisation ainsi que pour déterminer l'influence de facteurs tels que la génétique de l'hôte ou le sexe. Les modèles animaux seront utilisés en complément des essais cliniques et pour choisir les meilleures techniques d'immunisation candidates au passage en phase clinique. Nous aurons recours aux primates non humains (PNH) pour évaluer l'innocuité, l'immunogénicité et l'efficacité des candidats vaccins les plus avancés après une sélection stricte réalisée in vitro et chez le rongeur.

Le projet prévoit au maximum 112 PNH nés et élevés dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : immunisations, inoculation virale et prélèvements de sang, de moelle osseuse, 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. Des échantillons biologiques produits dans ce projet seront partagés avec d'autres laboratoires afin de limiter le recours au modèle primate non humain. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

3111. A l'instar du langage chez l'humain, le chant des oscines est acquis par transmission culturelle. Des travaux récents mettent en exergue des parallèles intéressants entre le chant des oiseaux et la musique dans l'induction de réponses émotionnelles. Ainsi, des aires homologues du circuit mésolimbique, activées à l'écoute de la musique chez l'Homme, sont aussi activées chez des femelles oiseaux lors de la diffusion de chants. Chez le Canari (*Serinus canaria*), les femelles sont particulièrement stimulées par certaines phrases de chant (dites « sexy ») produites par les mâles. Récemment, les méthodes d'imagerie cérébrale in vivo développées chez l'Homme ont été appliquées chez l'oiseau chanteur. En utilisant l'imagerie cérébrale (Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle ou IRMf), nous allons vérifier si l'écoute de phrases de chant « sexy » entraîne une activation particulière dans le cerveau de femelles Canari, en particulier dans les aires homologues du circuit mésolimbique. Le chant des oiseaux constitue un modèle biologique de choix pour étudier les substrats comportementaux, moléculaires et cellulaires de l'apprentissage vocal. Avec ce projet, nous espérons consolider ce modèle pour étudier les émotions chez les animaux.

Mesures prises pour le respect de la règle des 3Rs :

Remplacement : ce projet de recherches a pour but d'étudier les émotions chez un animal, le Canari domestique, pour lequel il a été clairement montré que les femelles expriment des préférences pour des phrases de chant particulières.

Réduire : nous utiliserons 12 oiseaux pour cette étude. Cet effectif garantit une analyse statistique fiable des résultats obtenus.

Raffinement : différentes mesures seront prises pour réduire l'inconfort, la douleur, la peur, le stress et la souffrance au cours de nos expériences. Les oiseaux seront transférés le jour de l'expérience du laboratoire au Centre de Neuro-imagerie (aller simple : 1h environ en voiture). Afin de limiter le stress, les oiseaux seront transportés par groupe de 2-4 individus. Les oiseaux seront laissés au repos pendant 1h minimum à leur arrivée avant de commencer les passations dans le scanner. Pendant l'expérience qui s'effectuera sous anesthésie (durée: 2h maximum), différents paramètres biologiques de l'animal (rythme cardiaque, température) seront mesurés. Ils retrouveront leur cage d'élevage au laboratoire d'origine le soir après l'expérience. Un expérimentateur effectuera une inspection visuelle à intervalles réguliers les oiseaux pendant le transport, lors de l'expérience et après leur retour au laboratoire. Les animaliers prendront le relais le lendemain de l'expérience.

A la fin de l'expérience, les oiseaux ne seront pas sacrifiés. Ils retrouveront leur cage d'origine et pourront éventuellement être réutilisés pour d'autres expériences d'éthologie. Nous avons également débuté récemment un programme de réhabilitation de nos animaux qui ne sont plus utilisés à des fins scientifiques. Ils sont alors transférés dans un sanctuaire (nous avons également un contact avec un parc zoologique).

3112. La grande alose (*Alosa alosa*) est un poisson migrateur anadrome (qui se reproduit en eau douce et réalise le reste de son cycle de vie en mer) dont l'aire de répartition et les indicateurs d'effectifs de population ont fortement chuté au cours des dernières décennies. Pour quantifier précisément les variations d'effectifs de la population, les paramètres du cycle de vie et l'impact de politiques de conservation/restauration, il est capital d'estimer l'effectif de géniteurs se reproduisant dans la rivière. A ce jour, seul un indicateur relatif existe. Il consiste à échantillonner le nombre d'actes reproducteurs sur les zones de ponte. L'acte reproducteur, appelé bull, est caractérisé par une nage circulaire des géniteurs à la surface de l'eau. Battant l'eau avec leur queue pour mélanger les gamètes pendant quelques secondes, ils produisent un son caractéristique que l'observateur peut comptabiliser. En théorie, plus il y a de géniteurs dans une rivière, plus on entend de bulls. Cependant, l'extrapolation précise du nombre de géniteurs présents à partir du nombre de bulls comptés nécessite de faire des hypothèses sur des aspects du comportement reproducteur encore largement inconnus. L'objectif du projet est donc de construire un modèle d'estimation fiable de l'effectif de géniteurs d'alose à partir du comptage des bulls. La partie du projet correspondant à l'expérimentation animale consiste à décrire les éléments clés du comportement reproducteur pour paramétrer le modèle.

Le nombre d'actes reproducteurs par individu ainsi que leur distribution spatiale et temporelle seront estimés par télémétrie sur 40 individus. Lors de leur passage à un barrage infranchissable équipé d'une passe-piège, des mâles et des femelles seront marqués avec des accéléromètres et des émetteurs radio. Les accéléromètres enregistrant à haute fréquence (30Hz) l'accélération des poissons dans les trois dimensions pendant toute la saison de reproduction (3 mois), l'analyse de leurs données permettra de déterminer le nombre et la distribution spatiale des bulls. Le suivi quotidien de la position des poissons renseignera sur la distribution spatiale des bulls, et permettra de récupérer les accéléromètres en fin d'expérience pour en décharger les données.

L'utilisation de l'accélérométrie pour cette problématique étant tout à fait innovante, deux expériences tests seront effectuées lors de la première année. La première expérience de test sera effectuée en conditions contrôlées dans un bassin reconstituant les caractéristiques d'un site de ponte. Dans cet environnement, le comportement reproducteur de 10 mâles et 10 femelles sera observé directement afin de vérifier l'adéquation entre les données générées par les accéléromètres et les observations visuelles. La deuxième expérience test sera effectuée en milieu naturel, dans les mêmes conditions que l'expérience principale. Cependant, alors que 10 individus porteront un accéléromètre et un émetteur radio, 10 autres ne porteront qu'un émetteur radio. La comparaison des déplacements des deux types d'individus nous permettra de tester si le marquage avec l'accéléromètre modifie la mobilité des aloses. Si les tests sont concluants, l'expérience sera transposée l'année suivante en milieu naturel, avec 30 individus équipés d'accéléromètres et d'émetteurs radio.

Ces expériences, en plus du paramétrage du modèle, fourniront des données intéressantes sur la sélection sexuelle ou l'utilisation de l'habitat par les aloses. Par ailleurs, les aloses ne se reproduisant que pendant une saison au cours de leur vie et mourant aussitôt après, les émetteurs radio nous permettront en fin de reproduction de récupérer des cadavres afin de collecter les données d'accélération. De plus, ces cadavres seront utiles à d'autres études impliquant l'analyse des otolithes (os

de l'oreille interne dont l'analyse physico-chimique peut renseigner sur la croissance ou l'habitat de l'animal) ou de contaminants dans les tissus.

3 R:

- Réduire : le nombre d'animaux que nous envisageons d'utiliser devrait permettre de représenter correctement la variabilité du comportement reproducteur de l'alose (nombre d'actes reproducteurs par individu) et d'explorer quelques paramètres pouvant affecter ce comportement (sexe des individus notamment). Si les tests préliminaires montraient que ce comportement n'est pas variable (ce qui serait très étonnant) nous réduirions le nombre d'individus utilisés lors la deuxième année d'expérimentation.

- Raffiner : l'essentiel du protocole se déroule en milieu naturel, sans possibilité de surveiller l'état des animaux. Pendant l'opération de marquage, nous privilégierons la rapidité pour limiter l'impact sur les poissons. L'essentiel des impacts négatifs du marquage se manifestant juste après le réveil, nous permettrons aux poissons de se réveiller dans une cage prévue à cet effet, et dont les individus pourront sortir à leur propre initiative. En milieu expérimental, le bassin sera aménagé de manière à mimer le milieu naturel (abris, alimentation continue en eau de la rivière). Ici, les poissons seront observés quotidiennement et un comportement inhabituel chez un individu (nage altérée, poissons complètement inactif) nous incitera à le recapturer, à le libérer de son marquage (il suffit de couper le fil attachant l'accéléromètre pour l'enlever) et à le placer dans un bassin pour observer son rétablissement. S'il ne se rétablit pas, nous l'euthanasierons.

- Remplacer : l'objet de l'étude est la collecte de données sur le comportement reproducteur de la grande alose, une espèce ayant un enjeu de conservation. Il est donc impossible de remplacer l'alose par une autre espèce. L'élevage d'alose n'étant pas au point, il est nécessaire de capturer des poissons sauvages.

3113. Notre projet est relatif à l'étude de l'apport de l'hème dans le tractus digestif et plus particulièrement sur son rôle dans la primo-colonisation bactérienne à la naissance.

L'hème, principal composant de l'hémoglobine, est la structure chimique qui porte le noyau de fer permettant le transport de l'oxygène dans le sang. Cette molécule est également essentielle dans de nombreux processus cellulaires et sert de cofacteur pour un certain nombre de protéines. Malgré son rôle essentiel, l'hème est aussi connu pour avoir un effet toxique sur les cellules. Dans le tractus digestif, l'hème en faibles quantités fait partie des métabolites naturellement présents mais l'augmentation de la quantité d'hème dans l'intestin est généralement un signe précoce d'une pathologie intestinale. Dans le cas des maladies inflammatoires chroniques par exemple, on observe l'apparition plus ou moins importante de saignements. Ce sang libère dans le tractus digestif de l'hème qui va alors amplifier, par son effet cytotoxique, la réaction inflammatoire de l'épithélium intestinal. Malgré tout, cette présence d'hème est également nécessaire à l'établissement de certains des microorganismes du tractus digestif.

Lors de la primo-colonisation de l'intestin, les différentes espèces bactériennes s'installent suivant un certain ordre, défini par les conditions régnant au sein du tractus digestif. Cette cinétique d'implantation va jouer sur l'obtention de l'équilibre final du microbiote intestinal. Certaines espèces bactériennes naturellement présentes en grande quantité, comme *Bacteroides thetaiotaomicron*, ont un besoin fort en hème pour croître normalement. S'il existe des différences dans la quantité d'hème disponible dans le tractus digestif, les espèces sensibles à l'hème s'installeront de manière différente selon les individus.

Le but de notre étude est de voir si en modulant la quantité d'hème présente dans le tractus digestif, nous pouvons modifier les capacités d'implantation de *Bactéroïdes*.

Pour cela, nous allons implanter, par gavage, dans le tractus digestif de souris sans germes, une souche de *Lactococcus lactis*, bactérie alimentaire du yaourt, capable d'exprimer une hème-oxygénase, molécule capable de dégrader l'hème. Nous allons ensuite faire un second gavage avec une quantité faible de *Bacteroides thetaiotaomicron* et suivre l'implantation de cette bactérie dans le tractus digestif de la souris par dénombrement dans les fèces.

Ces expériences mettent en œuvre des techniques non invasives d'étude chez la souris, le gros des expériences se limitant sur une durée courte à des manipulations limitées des animaux (prélèvement de fèces essentiellement). La procédure utile pour ce sujet se déroulera sur environ six à huit mois.

L'utilisation de souris de laboratoire ne peut pas être évitée, car nous mettons en évidence une interaction entre l'hôte et la bactérie, et il n'existe pas de méthode alternative à l'étude d'une telle interaction.

Le nombre d'animaux sera limité au maximum, soit 3 lots de 5 souris pour une manip préliminaire et 4 lots de 6 souris pour le test d'implantation. Afin d'optimiser le nombre d'animal tout en gardant des résultats exploitables en terme statistique, chaque expérience sera faite 3 fois. Nous allons donc utiliser 117 souris au total.

Les manipulations effectuées n'infligent pas de douleur aux animaux, mais pour limiter au maximum le stress, les souris, animaux sociables, sont hébergés en groupe et leur milieu de vie est enrichi en objets susceptibles d'être rongés ou déchiquetés et pouvant servir à la construction de nids (papiers, cartons, etc.).

3114. Ce protocole vient en complément d'un protocole d'expérimentation animale approuvé par le précédent comité d'éthique. Notre projet consiste à comprendre comment l'innervation sensorielle et le système immunitaire contrôlent les processus de régénération du tissu adipeux sous-cutané après ablation partielle. Aucun modèle de remplacement n'existe pour étudier le retour à l'intégrité d'un tissu après la lésion. Afin de faire une étude approfondie sur la régénération, nous utiliserons différentes souches de souris que nous étudierons en cinétique (24-48h, 1-2 semaines, 1-2 mois), par différentes techniques. Les différents mécanismes du retour de l'intégrité tissulaire seront étudiés après activation ou inhibition du système nerveux et/ou du système immunitaire. Pour réaliser ce projet, nous envisageons donc de travailler sur 7 groupes d'animaux indépendants. Afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, nous avons évalué à 4349, le nombre de

souris nécessaires (voir détail 3.4.10). Nous apporterons une attention particulière au raffinement et respect de l'animal. En effet, les animaux seront hébergés au nombre de 4/cages permettant le respect du caractère grégaire de la souris. Nous proposons également d'enrichir l'environnement des souris, favorisant ainsi le bien-être animal. De plus, la surveillance des souris sera quotidienne permettant ainsi de sacrifier les animaux en cas de comportements anormaux et de douleurs intenses.

3115. Le cancer du sein (CS) est le cancer féminin le plus fréquent. Il affecte plus de 1.7 millions de femme dans le monde et environ 500 000 patientes meurent chaque année de cette maladie.. Le Tamoxifène (Tam) reste un traitement majeur du CS et il est proposé aux USA également pour leur prévention. Nous avons caractérisé un « suppresseur de tumeur». Ce suppresseur de tumeur est montré pouvant réguler positivement le système immunitaire (SI). Du fait de l'importance du système immunitaire dans la réponse anti-tumorale chez le patient, l'étude de ce suppresseur, de sa cible et du mécanisme d'action mise en jeu pour activer le SI paraît un enjeu important pour proposer des alternatives thérapeutiques pour contrer la résistance aux traitements standards actuels. Pour évaluer la pertinence de ces découvertes et de leur action dans un système intégré, nous devons étudier les effets anti-tumoraux de ce suppresseur et son action sur le SI in vivo chez des souris greffées ou non avec des tumeurs mammaires. Ces études seront réalisées chez des souris immunocompétentes et nécessiteront un nombre total de 1986 souris. Le nombre de souris utilisées sera le nombre minimal d'animaux qui permettra d'avoir des résultats significativement exploitables, les animaux utilisés au cours de cette expérience seront maintenus dans des conditions optimales (surveillance régulière de leur bien-être, enrichissement du milieu) et les lignées choisies sont représentatives d'une part de l'hétérogénéité des cancers mammaires qui regroupent plusieurs sous types moléculaires et de la résistance au tamoxifène. D'autre part, pour diminuer le nombre d'expériences et d'animaux, des expériences ont été préalablement réalisées in vitro pour caractériser les effets anti-tumoraux de cette molécule ainsi que son action sur le SI.

3116. L'espérance de vie dans les pays industrialisés n'a cessé de progresser depuis le début du siècle dernier. D'après l'Insee, au 1er janvier 2050, la France métropolitaine compterait 70,0 millions d'habitants, soit 9,3 millions de plus qu'en 2005. En 2050, un habitant sur trois serait âgé de 60 ans ou plus, contre un sur cinq en 2005. La part des jeunes diminuerait, ainsi que celle des personnes d'âge actif. En 2050, 69 habitants seraient âgés de 60 ans ou plus pour 100 habitants de 29 à 60 ans, soit deux fois plus qu'en 2005. Si, du point de vue d'une première analyse, le vieillissement de la population pourrait être considéré comme un signe indiscutable de progrès, il présente néanmoins des aspects négatifs. En effet, le vieillissement est un processus complexe qui reflète les effets biologiques de l'écoulement du temps, y compris la baisse des capacités physiologiques et cognitives de l'organisme.

Ainsi, un des enjeux de la recherche fondamentale sur les mécanismes de la plasticité comportementale et cérébrale consiste à comprendre les événements biologiques conduisant à l'apparition des troubles cognitifs. Une attention toute particulière est accordée à la recherche des mécanismes biologiques qui permettraient de mieux comprendre un dysfonctionnement cérébral et une altération des processus de la mémoire lors du vieillissement normal ou pathologique. Dans ce contexte, notre projet vise à identifier ces mécanismes cellulaires et moléculaires qui peuvent être altérés au cours du vieillissement cérébral. Nous savons qu'une altération des mécanismes épigénétiques peut contribuer à ces déficits au niveau de la plasticité synaptique et des fonctions cognitives associées. En effet, les mécanismes épigénétiques sont altérés avec l'âge, contribuant alors au déclin cognitif qui accompagne la sénescence chez les humains et les animaux. Notre hypothèse stipule que l'étude des régulateurs des mécanismes épigénétiques, tels que la protéine Sin3A, peuvent permettre de mieux comprendre un dysfonctionnement cérébral lié à l'âge. Dans ce projet, nous examinerons si un effet facilitateur des processus cognitifs liés à une perte de fonction de la protéine Sin3A peut restaurer un déficit de mémoire présent chez des souris âgées. Nous réaliserons des tests de comportement et de mémoire chez une souris déficiente pour la protéine Sin3A et à différents âges. Ceci nous permettra de déterminer le rôle de ce corépresseur de la transcription Sin3A dans les processus mnésiques au cours du vieillissement normal. Nous rechercherons ensuite quels remodelages des circuits neuronaux et quels mécanismes moléculaires accompagnent une altération de la plasticité cérébrale et des troubles cognitifs liés à l'âge. De plus, nous examinerons la relation entre Sin3A et un dysfonctionnement cognitif lié à l'âge en étudiant l'excitabilité neuronale et l'activité des réseaux cérébraux impliqués dans les fonctions cognitives.

Sur l'ensemble de ce projet, nous utiliserons 160 souris transgéniques (80 Sin3A<sup>flox/flox</sup>;Cre et 80 Sin3A<sup>flox/flox</sup>) qui sont des modèles reconnus pour la recherche fondamentale et sans phénotype dommageable. Chaque animal pourra être soumis plusieurs fois à la même tâche mnésique (en utilisant des objets différents), ce qui nous permettra de tester les mêmes individus à différents délais post-acquisition (mémoire à court ou à long terme). Cela permettra également de diminuer les effectifs par lot. Les conditions d'hébergement dans un établissement utilisateur doté d'une structure du bien-être animal et les méthodes utilisées seront appropriées pour réduire le plus possible toute angoisse ou dommage durables que pourraient subir les animaux. Le suivi journalier des animaux sera clairement défini avec interruption de l'expérimentation si l'un des critères d'arrêt est atteint. De cette manière, la règle des trois R sera respectée.

3117. La Dystrophie musculaire de Duchenne (myopathie) se manifeste par une dégénérescence progressive des muscles squelettiques, lisses et cardiaque. Le décès des patients est consécutif à une cardiomyopathie sévère associée souvent à un déficit respiratoire. Il n'existe actuellement pas de traitement efficace pour cette maladie.

Notre objectif est d'évaluer chez les souris mdx (modèle de la myopathie de Duchenne), une voie thérapeutique nouvelle pour la Dystrophie musculaire de Duchenne. Le calcium musculaire est essentiel à la contraction musculaire et le contrôle étroit de sa concentration est nécessaire à la vie cellulaire. Parmi les hypothèses les plus courantes expliquant la myopathie, la dérégulation du stockage du calcium de la cellule musculaire pourrait être à l'origine des symptômes de la maladie. En effet, il



a été montré qu'une augmentation excessive à pour conséquence d'activer de nombreuses protéases dépendantes du calcium et ceci conduisant à la mort cellulaire. Une piste thérapeutique intéressante serait donc de réduire les perturbations de l'homéostasie calcique. Pour tester cette hypothèse nous avons mis en place des nouveaux modèles de souris mdx déficientes en molécules contrôlant le calcium des cellules. Nous souhaitons évaluer la durabilité des effets bénéfiques in vivo par un suivi de l'évolution des paramètres fonctionnels, d'inflammation et de mort cellulaire à différents âges chez la souris mdx et chez la souris "déficiente" en comparaison avec des souris saines. Ainsi, nous avons mis en place un protocole expérimental permettant de réduire au maximum le nombre de souris nécessaire. Il nous faudra étudier 440 souris au total pour garantir la validité statistique de l'étude réalisée sur quatre ans. A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour cette étude selon les références européennes officielles (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing). Dans un souci de raffinement, nous allons veiller au bien-être des animaux qui seront élevés en milieu enrichi.

Les procédures expérimentales ont été conçues de sorte à supprimer ou limiter toute souffrance physique des souris et les souris seront surveillées pour évaluer d'éventuelle souffrance, détresse ou inconfort. Ce suivi comporte une évaluation de la perte de poids, de l'apparence physique et du comportement de l'animal.

3118. Le diabète de type 2 est associé à une inflammation du pancréas endocrine. Cette inflammation altère la fonctionnalité et la survie des cellules produisant l'insuline, participant ainsi à l'aggravation du diabète de type 2. Notre projet a pour but d'identifier les mécanismes qui régulent cette inflammation. Nous nous intéresserons à l'implication du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR)  $\alpha 7$  dans la régulation de l'inflammation du pancréas endocrine. Ce projet s'appuiera sur différents modèles murins et sur la mise en place d'un modèle de souris rendues diabétiques par injection de streptozotocine à l'âge adulte (10 semaines). A partir de différentes approches, nous étudierons d'une part comment le nAChR  $\alpha 7$  est impliqué dans l'inflammation du pancréas associée au diabète et d'autre part comment arrêter l'inflammation par le nAChR  $\alpha 7$  des cellules produisant l'insuline. Cette étude intégrative ne peut être remplacée par d'autres moyens que les modèles animaux, lesquels sont les seuls à intégrer la composante inflammatoire qui joue un rôle important dans l'état diabétique. Le recours aux souris est donc indispensable pour ce projet qui utilisera le minimum de souris nécessaire en respectant le plus possible le bien-être animal (raffinement des procédures et amélioration de leur environnement). Nous suiverons quotidiennement les animaux afin de s'assurer qu'ils ne soient pas dans un état diabétique sévère. Le cas échéant, nous procéderons à leur mise à mort. Au total, 720 souris seront utilisées sur une période de 5 ans. La réalisation de ce projet devrait nous permettre d'identifier de nouveaux médicaments à visée anti-inflammatoire véritablement efficace pour prévenir et/ou traiter le diabète de type 2.

3119. L'utilisation des animaux de laboratoire dans les procédures expérimentales faiblement invasives et invasives est strictement encadrée par la loi.

La bonne pratique d'expérimentation nécessite une bonne connaissance de la biologie des espèces utilisées et aussi la connaissance théorique et pratique des méthodes expérimentales sur le modèle animal. L'objectif de ce projet est de fournir les connaissances indispensables et d'enseigner les bonnes pratiques d'expérimentation animale.

Cette formation s'adresse aux personnes réalisant les procédures expérimentales dans le cadre des études réalisées par notre société – prestataire de services en recherche préclinique.

Chaque technicien de recherche suivra un programme de formation, dont une partie nécessite l'utilisation des animaux vivants. Dans le cadre de ce programme, chaque technicien doit prendre connaissance et maîtriser les techniques d'administration des produits, les techniques de prélèvement sur les souris et les rats.

La formation de chaque technicien sera encadrée par le personnel formé avec les compétences reconnues. Le vétérinaire assure la formation et la validation des compétences en anesthésie, analgésie et euthanasie.

Au cours de ce projet, nous prévoyons de former entre 20 et 25 techniciens d'expérimentation animale : un programme complet pour des nouveaux techniciens et la remise régulière à niveau pour les techniciens déjà formés.

Les formations nécessiteront au maximum 4000 rongeurs sur 5 ans.

Application du principe de Réduction : Pour former le personnel, nous utiliserons principalement les animaux résidus des études de gravité modérée. Plusieurs procédures faiblement invasives, telles que les injections et les prélèvements, seront réalisées sur les mêmes animaux.

Application du principe de Raffinement : Pour cette formation seront utilisés exclusivement les animaux en bon état général. L'état des animaux sera régulièrement évalué par le vétérinaire ou par la personne chargée du bien-être des animaux. Toutes les procédures réalisées sur chaque animal seront enregistrées et les délais de repos définis avec le vétérinaire seront respectés.

3120. Le poisson-zèbre est devenu récemment un modèle d'étude important des relations hôte-pathogène, en particulier parce qu'au cours des premiers stades de développement, les représentants de cette espèce sont petits, transparents, et permettent d'obtenir une grande qualité d'image lors de nos études faisant intervenir l'imagerie in vivo. L'existence d'outils de manipulation de l'expression des gènes et de nombreuses lignées d'animaux exprimant des mutations différentes, ainsi que la connaissance complète du génome de cette espèce concourent aussi au succès de ce modèle. De nombreuses formes de maladies humaines ont été développées chez le poisson-zèbre, non seulement chez la "larve" ou le jeune alevin, mais aussi aux stades plus tardifs; le poisson-zèbre au stade adulte a été en particulier utilisé pour l'étude des relations entre les mycobactéries et leur hôte.

Il devient donc de plus en plus important de développer une bonne connaissance du système immunitaire de l'adulte, qui comporte des composantes innées et adaptatives comme celui de la larve, utilisée pour caractériser l'immunité naturelle.

Nos projets de recherche visent donc à :

- mieux comprendre les mécanismes de défense du poisson zèbre contre différents pathogènes pour développer des modèles de maladies infectieuses humaines permettant de comprendre les mécanismes des interactions entre le pathogène et son hôte vertébré, et aussi de cribler des médicaments/remèdes pour contrôler l'infection.

- développer des vaccins efficaces contre des pathogènes afin de disposer de systèmes d'étude de l'immunité spécifique et de la mémoire dans ces modèles. Les poissons sujets à infection expérimentale et ou vaccination sont analysés par différentes approches immunologiques et moléculaires.

Les expériences durent de 3 à 6 semaines pour des infections expérimentales; pour les tests de vaccination, les animaux sont gardés le temps que la réponse non spécifique soit revenue à son niveau initial, c'est à dire entre 2 et 6 mois selon que les protocoles visent à tester la protection à court ou long terme.

Les expériences mises en œuvre sont:

1- des immunisations visant à induire une réponse immunitaire spécifique (y compris avec des vaccins)

2- des épreuves infectieuses par bain ou par injection permettant de tester la protection induite par une immunisation et/ou d'induire une réponse.

Les prélèvements sont effectués post mortem.

3121. Nos projets s'inscrivent dans une démarche compatible avec la règle des 3R. Il est important de noter que le développement du modèle poisson zèbre s'inscrit dans le remplacement d'expérimentations effectuées sur des mammifères.

L'ensemble des procédures proposées ne pourrait être mis en œuvre dans des modèles in vitro, dans la mesure où les propriétés de sensibilité, ou de réponse aux infections sont exprimées à l'échelle de l'individu et dans une dynamique temporelle de quelques semaines à quelques mois.

Les lignées cellulaires (in vitro) sont utilisées chaque fois que cela est possible par exemple pour pré-évaluer l'activité d'adjuvants/stimulants; nous avons ainsi spécifiquement développé des lignées cellulaires issues de poisson-zèbre au laboratoire.

Nous veillons à réduire les effectifs de poissons autant qu'il est possible tout en nous assurant d'obtenir des résultats significatifs. Nous prévoyons d'utiliser au total moins de 1180 poissons pour l'ensemble de ce projet ambitieux, correspondant essentiellement à des essais vaccinaux. Les différentes procédures de ce projet pourront être répétées plusieurs fois.

Nous effectuons les expériences dans un environnement adapté au poisson zèbre au stade considéré. Les animaux sont gardés en lots et constituent les uns pour les autres un élément important d'enrichissement du milieu. Il doit être noté qu'il est important de ne pas introduire dans les bacs des objets sur lesquels les poissons se frottent.

3122. Le poisson-zèbre est devenu récemment un modèle d'étude important des relations hôte-pathogène, en particulier parce qu'au cours des premiers stades de développement, les représentants de cette espèce sont petits, transparents, et permettent d'obtenir une grande qualité d'image lors de nos études faisant intervenir l'imagerie in vivo. L'existence d'outils de manipulation de l'expression des gènes et de nombreuses lignées d'animaux exprimant des mutations différentes, ainsi que la connaissance complète du génome de cette espèce concourent aussi au succès de ce modèle. De nombreuses formes de maladies humaines ont été développées chez le poisson-zèbre, non seulement chez la "larve" ou le jeune alevin, mais aussi aux stades plus tardifs; le poisson-zèbre au stade adulte a été en particulier utilisé pour l'étude des relations entre les mycobactéries et leur hôte.

Il devient donc de plus en plus important de développer une bonne connaissance du système immunitaire de l'adulte, qui comporte des composantes innées et adaptatives comme celui de la larve, utilisée pour caractériser l'immunité naturelle.

Nos projets de recherche visent donc à mieux comprendre, en particulier par des approches d'imagerie, les mécanismes de défense du poisson zèbre contre différents pathogènes pour développer des modèles de maladies infectieuses humaines permettant de comprendre les mécanismes des interactions entre le pathogène et son hôte vertébré, et aussi de cribler des médicaments/remèdes pour contrôler l'infection.

Les jeunes poissons zèbre sont anesthésiés puis immobilisés en milieu liquide pour suivre par imagerie in vivo le comportement des cellules impliquées dans la réponse immunitaire après administration d'antigène ou induction d'une inflammation locale. Les expériences durent de quelques heures pour suivre la réponse immédiate à quelques jours quand la stimulation doit se développer avant imagerie. Les prélèvements nécessaires à notre étude sont effectués post mortem.

3123. Nos projets s'inscrivent dans une démarche compatible avec la règle des 3R. Il est important de noter que le développement du modèle poisson zèbre s'inscrit dans le remplacement d'expérimentations effectuées sur des mammifères.

L'ensemble des procédures proposées ne pourrait être mis en œuvre dans des modèles in vitro, dans la mesure où les propriétés de sensibilité, ou de réponse aux infections sont exprimées à l'échelle de l'individu; c'est précisément dans l'imagerie in vivo des infections que réside l'intérêt majeur de ce modèle.

Les lignées cellulaires (in vitro) sont utilisées chaque fois que cela est possible par exemple pour pré-évaluer l'activité d'adjuvants/stimulants; nous avons ainsi spécifiquement développé des lignées cellulaires issues de poisson-zèbre au laboratoire.

Nous veillons à réduire les effectifs de poissons autant qu'il est possible tout en nous assurant d'obtenir des résultats significatifs. Nous prévoyons d'utiliser au total moins de 900 poissons pour l'ensemble de ce projet concernant l'étude de la réponse immunitaire par imagerie in vivo.

Nous effectuons les expériences dans un environnement adapté au poisson zèbre au stade considéré.

3124. La Dengue est une maladie virale causée par un arbovirus et transmise par l'intermédiaire d'un vecteur, le moustique (*Aedes*). L'OMS considère qu'environ 40 millions de personnes sont potentiellement exposées à ce virus dans le monde. Dans 2,5% des cas, cette infection conduit à une forme hémorragique potentiellement mortelle chez l'Homme. Il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique et aucun vaccin efficace permettant de se protéger de cette maladie.

L'objectif de ce projet est de sélectionner des « candidats vaccins » qui pourraient avoir des applications cliniques chez l'Homme à moyen terme. Il comprend plusieurs étapes : la mise au point du modèle expérimental (choix des souches de virus de deux sérotypes différents permettant de reproduire expérimentalement l'infection, choix de la voie d'inoculation du virus) puis deux essais de protection (un pour chaque sérotype Dengue) par différents candidats vaccins sur le modèle d'infection mis au point lors des premières étapes.

Les essais de protection par des vaccins ne peuvent être réalisés que sur des organismes entiers ; le modèle animal est nécessaire pour apporter le maximum d'informations avant la réalisation d'essais chez l'Homme. Actuellement, il est impossible de ne pas recourir à des modèles animaux. Le modèle animal choisi pour ce projet est le macaque cynomolgus afin d'avoir d'une part une réponse vaccinale similaire à celle qui sera obtenue chez l'Homme et d'autre part un modèle d'infection par le virus de la Dengue comparable à la maladie humaine.

Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit au maximum tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non-paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (limitation des volumes prélevés, prélèvements sous anesthésie...). Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de limiter la durée de l'infection (60 jours après infection) et de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires de la vaccination), le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 120 animaux pour la mise au point des procédures sur un sérotype puis 45 animaux pour l'autre sérotype, avec réutilisation des mêmes procédures mises au point pour le premier sérotype testé. Ces animaux proviennent d'élevages reconnus. Les différentes procédures expérimentales de ce projet sont classées au niveau modéré afin de prendre en compte l'hébergement individuel nécessaire pour maîtriser les éventuelles surexpositions virales et les contaminations croisées entre individus. Le projet est l'objet d'une évaluation par le comité d'éthique et ses recommandations seront prises en compte.

3125. Le modèle brebis est un modèle classiquement utilisé pour les études de régénération osseuse. Notre projet a deux objectifs principaux : (1) de modéliser finement l'ossification dans cette espèce par examens radiographiques au CT scan sur des animaux à différents âges de leur vie et (2) de comparer la morphologie osseuse pour 2 races de moutons de différentes provenances utilisés dans la recherche biomédicale.

Nous examinerons 40 brebis appartenant à la même race et d'un élevage partiellement fermé pour construire une base de données suffisante à nos études ultérieures concernant la régénération osseuse sur ce même modèle. Par élevage fermé, nous entendons un élevage qui fonctionne en auto-renouvellement c'est-à-dire sans entrée d'animaux extérieurs au troupeau ; ce type d'élevage permet une meilleure veille sanitaire et garantit la stabilité génétique et physiologique des animaux. Nous allons comparer ces données avec celles obtenues par la même technique (CT scan) lors d'une étude précédente sur une autre race de moutons en provenance d'un élevage ouvert (prélèvements d'animaux de différentes races dans des élevages différents : la diversité génétique et physiologique ainsi que les états sanitaires sont très variables). Nous souhaitons identifier et quantifier la variabilité interindividuelle (pour la même race) et interraciale des moutons. Notre but ultime est de choisir le modèle le plus homogène et reproductible pour les études orthopédiques. Ceci permettra, dans le futur, de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Cinq brebis (Booroola) présentant une mutation pouvant influencer le phénomène d'ossification seront également imagées.

Le nombre total d'animaux utilisés dans le projet est donc de 45.

Remplacement : nous avons mis au point un fantôme de test c'est-à-dire un objet qui reproduit les propriétés des tissus biologiques et permettant de simuler des examens d'imagerie médicale ; il est utilisé pour les procédures de contrôle qualité et de calibrage ou étalonnage des machines d'imagerie pour effectuer diverses mesures notamment sur la qualité de l'image, l'irradiation, etc.

Ce fantôme nous permet de paramétrer au mieux nos examens en fonction de nos attentes. Nous ne pouvons cependant pas nous dispenser d'examen sur organismes vivants et d'un bon état physiologique.

Réduction : Nous avons besoin d'un échantillonnage important (10 animaux de chaque âge entre 1 et 4 ans) pour définir très précisément l'ossification de différents segments de l'organisme à tous ces âges. Nos animaux n'ayant subi qu'une procédure légère d'anesthésie et d'imagerie aux rayons X, nous pourrions envisager une réutilisation ultérieure de ces animaux ou un retour à l'élevage.

Raffinement : les animaux seront laissés en groupes sociaux stables, sans aucun isolement. Ils seront hébergés sur paille de qualité avec foin à volonté. L'anesthésie générale sera induite dès la sortie du groupe afin d'éviter tout stress.

3126. L'étude des mécanismes impliqués dans les maladies humaines et l'étude d'efficacité de nouvelles thérapies de ces maladies doit au final être évaluée sur les modèles animaux vivants.

Cependant, en raison de différences génétiques et biologiques entre les différentes espèces animales et les hommes, les résultats de ces études ne peuvent pas être toujours transposés à l'homme.

En raison d'absence de modèles prédictifs de l'action des médicaments sur l'homme, le développement de nombreux médicaments s'arrête en phase clinique.

L'utilisation des espèces plus élevées et plus proches de l'homme, telles que les primates non-humains, doit être évitée.

Depuis longtemps, les chercheurs tentent de modifier les animaux modèles tels que les rongeurs pour les rendre biologiquement plus proches de l'homme. Le développement des rongeurs fortement immunodéficients, donc plus réceptifs aux cellules humaines, a permis de perfectionner ces modèles.

Notre société, considérée comme précurseur dans le domaine des animaux humanisés, est devenue le leader mondial et un prestataire de services dans la recherche préclinique.

L'objectif de notre projet de recherche est donc de développer de nouveaux modèles de rongeurs chez lesquels certaines populations cellulaires, telles que les cellules du système immunitaire ou les hépatocytes, seront remplacées par celles de l'homme provenant soit d'un patient soit d'un donneur sain. De plus, ces animaux pourront être greffés avec des cellules pathologiques telles que les cellules tumorales, cibles de thérapies.

Par la suite, nous allons évaluer sur ces animaux l'efficacité des thérapies avec des composés développés par nos clients ou par la branche recherche de notre société.

Pour réaliser ce travail de recherche et ces prestations de service, nous prévoyons d'utiliser sur 5 ans : 25000 souris immunodéficientes et 2500 rats porteurs de différentes modifications génétiques les rendant plus permissives à la survie et au développement des différentes populations cellulaires humaines.

Dans l'objectif de raffinement, toutes les procédures techniques sur les animaux seront réalisées selon les standards validés par la structure chargée du bien-être animal (fréquence de prélèvements de sang, les méthodes d'administration des composés, ...). Chaque développement de nouveau modèle sera précédé d'une étude pilote. Pendant cette étude les experts (dont le vétérinaire) analyseront les conséquences des procédures sur le bien-être des animaux, la validité des résultats scientifiques obtenus, et ils détermineront les points limites ainsi que la stratégie du suivi clinique. Les résultats de ces études seront présentés au comité éthique. D'autre part, pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans ces procédures, nous allons utiliser des biomarqueurs et des techniques faiblement invasives d'imagerie chez le petit animal.

3127. Notre société, prestataire de services en recherche préclinique, développe des modèles de recherche et propose un large panel de modèles in vivo adaptés pour des études de pharmacocinétique, de pharmacologie, d'évaluation de l'efficacité des composés thérapeutiques et pour la recherche translationnelle.

L'objectif de ce projet de recherche est de développer de nouveaux modèles expérimentaux les plus prédictifs possible afin de mimer les pathologies humaines et de tester sur ces modèles de nouvelles thérapies anticancéreuses.

Dans les procédures réalisées sur les modèles animaux de cancers, les composés seront évalués dans un environnement physiologique. Cependant, les résultats de ces études ne sont pas toujours transposables à l'homme.

Pour cette raison, nous avons aussi développé sur des souris et des rats immunodéficients des modèles de xéno greffe de cellules cancéreuses ou des fragments de cancers obtenus à partir de patients. Ces modèles permettent de mieux évaluer l'efficacité des molécules destinées à traiter les cancers chez l'homme.

Des cellules ou des fragments cancéreux seront greffés en sous-cutanée, ou directement dans un tissu cible de la tumeur pour mieux simuler l'environnement originel du cancer. Les animaux seront ensuite traités avec de nouvelles thérapies anticancéreuses. Les animaux seront suivis individuellement et ils seront obligatoirement euthanasiés aux points limites définis dans chaque procédure.

Durant les cinq années de ce projet, nous allons utiliser 125000 animaux soit 105000 souris et 20000 rats.

Ces animaux seront utilisés dans six procédures multiples au cours desquelles seront évalués différents médicaments :

- Toxicité, pharmacodynamique, pharmacocinétique de composés thérapeutiques chez le rongeur porteur ou non de tumeur
- Évaluation d'efficacité anti-tumorale de composés chez le rongeur porteur de tumeur (lignée cellulaire ou fragment dérivé de tumeur de patient) greffée en sous cutané

- Évaluation d'efficacité anti-tumorale de composés chez le rongeur porteur de tumeur (lignée cellulaire ou fragment dérivé de tumeur de patient) greffée chirurgicalement dans différents organes cibles de la tumeur (greffe orthotopique).

- Évaluation d'efficacité anti-métastatique de composés chez le rongeur porteur de tumeur métastatique (lignée cellulaire ou fragment dérivé de tumeur de patient)

Dans l'objectif de raffinement, toutes les procédures techniques sur les animaux seront réalisées selon les standards validés par la structure chargée du bien-être animal (fréquence de prélèvements de sang, les méthodes d'administration des composés, ...).

Chaque développement de nouveau modèle sera précédé d'une étude pilote. Pendant cette étude les experts (dont le vétérinaire) analyseront les conséquences des procédures sur le bien-être des animaux, la validité des résultats scientifiques obtenus, et ils détermineront les points limites ainsi que la stratégie du suivi clinique. Les résultats de ces études seront présentés au comité éthique.

D'autre part, pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans ces procédures, nous allons utiliser des biomarqueurs et des techniques faiblement invasives d'imagerie chez le petit animal.

3128. L'obésité est une maladie associée à de nombreuses complications telles que l'hypertension, des troubles cardiovasculaires ou bien le diabète de type II. Sa prévalence est de plus en plus importante, notamment dans nos sociétés occidentales où le mode de vie est sédentarisé et où l'alimentation est de plus en plus riche en sucres et en matières grasses. Bien que l'étiologie de l'obésité reste controversée, il est admis qu'elle résulte d'un déséquilibre entre l'énergie apportée par la nourriture, et l'énergie dépensée pour maintenir le bon fonctionnement de l'organisme et une activité physique.

Le cerveau est largement responsable de la régulation de cette balance énergétique, et il contrôle la sensation de faim et le besoin de se dépenser. Nous savons qu'une région du cerveau, appelée hypothalamus, est notamment très importante dans le maintien d'un poids stable, et les neurones qui se trouvent dans cette région sont aujourd'hui largement étudiés.

Parmi les cellules localisées dans l'hypothalamus, on trouve également des cellules fondamentales car elles organisent les connexions entre neurones, et apportent les nutriments nécessaires à leur survie. Ces cellules, appelées astrocytes, ont un rôle encore méconnu. On sait déjà qu'elles peuvent réguler les communications entre neurones, et qu'elles réagissent différemment selon la quantité de nutriments (sucres et graisses notamment) qui leurs sont apportées. Nous voulons savoir quel est le mécanisme de ces cellules, et comprendre quels dérèglements de ces mécanismes peuvent aboutir à une surcharge pondérale.

Pour cela, nous avons choisi de travailler avec des modèles de souris génétiquement modifiés pour que nous puissions spécifiquement activer ou inactiver les astrocytes. Ceci est possible grâce à l'injection d'un composé non toxique pour les souris, le clozapine-N-oxyde, qui ira spécifiquement moduler positivement ou négativement l'activité d'astrocytes génétiquement modifiés pour pouvoir répondre à ce composé. Une fois que nous pourrons contrôler ces cellules, nous voulons étudier le comportement des souris, notamment le comportement alimentaire (quantité de nourriture ingérée, fréquence des repas, préférence pour un aliment, motivation à chercher de la nourriture...), ainsi que leur métabolisme (tolérance au glucose, résistance à l'insuline, stockage des graisses, métabolisme énergétique...). Dans le but de réduire au maximum le nombre d'animaux employés (600 animaux sur 4 ans), nous réutiliserons au maximum les mêmes animaux pour diverses expériences. Tous nos animaux seront suivis dans le temps et nous disposons de procédures bien définies pour raffiner au maximum nos protocoles et limiter toute souffrance animale. Notre laboratoire respecte la règle des 3R : raffinement, réduction du nombre d'animaux, remplacement.

3129. Les calcifications vasculaires sont des dépôts de cristaux de calcium dans la paroi des vaisseaux sanguins (particulièrement les artères). Elles sont une complication classique de l'insuffisance rénale chronique. La calcification vasculaire est un processus actif de formation osseuse par des cellules des vaisseaux sanguins qui deviennent des cellules calcifiantes (très similaires à des cellules osseuses). Les calcifications vasculaires contribuent à la surmortalité cardiovasculaire chez les patients insuffisants rénaux. Les mécanismes moléculaires impliqués dans leur formation restent toutefois encore méconnus. La sphingosine 1-phosphate (S1P) est un lipide bioactif qui stimule la prolifération et la migration cellulaires ainsi que l'angiogenèse à travers différentes voies comme la phospholipase D (PLD). La S1P a un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie osseuse et du système cardiovasculaire. Des études préliminaires réalisées sur des modèles cellulaires ainsi que dans des modèles ex-vivo montrent une implication de la voie métabolique S1P/PLD dans le processus de transformation des cellules musculaires lisses vasculaires en cellules vasculaires calcifiantes.

L'objectif du projet de recherche est de valider ces résultats sur un modèle animal reproduisant les calcifications vasculaires liées à l'insuffisance rénale chronique (IRC). Cette étude permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les calcifications vasculaires associées à l'IRC et notamment trouver un lien entre les calcifications vasculaires et la voie S1P/PLD. Cette étude implique l'utilisation de 24 rats Sprague-Dawley mâle. Le présent protocole est raffiné par l'utilisation d'un modèle non chirurgical pour induire l'IRC qui ne s'accompagne d'aucune douleur ou mortalité pour les animaux à comparaison du modèle chirurgical traditionnel de néphrectomie.

3130. *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie qui peut devenir pathogène chez des patients fragilisés (opérés récents, patients sous assistance respiratoire ou porteurs de dispositifs médicaux, chimiothérapie, ...). Elle représente environ 11% des infections contractées à l'hôpital et peut être responsable d'infections aiguës (septicémie, endocardite, pulmonaires, urinaires, ...) ou chroniques chez des patients immunodéprimés (mucoviscidose, sida, cancer). Ces pathologies nécessitent l'utilisation de traitements antibiotiques d'autant plus coûteux qu'un grand nombre de souches cliniques sont multi résistantes aux antibiotiques. *P. aeruginosa* fait partie d'une famille de bactéries pathogènes qui se caractérisent par leur capacité à échapper aux traitements antibactériens disponibles, et pour lesquelles il y a un besoin urgent de nouveaux types de médicaments. Dans ces conditions, une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu par la bactérie pour infecter l'Homme et la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques sont indispensables. Après une étude in vitro, les expérimentations sur modèle animal sont maintenant obligatoires afin d'évaluer l'effet des différentes souches de bactéries dans un système intégré, permettant ainsi de comprendre les réponses du système immunitaire face à une infection bactérienne.

Le but de ce projet est d'étudier les mécanismes mis en jeu par les bactéries dans un modèle d'infection chez la souris. Pour cela, nous utiliserons 7 souches de *P. aeruginosa* pour infecter par voie nasale (vn) et par voie intraveineuse (iv) des souris BalB/C afin de suivre le nombre de bactéries présentes dans le sang au cours du temps et la charge bactérienne dans différents organes. Nous envisageons d'utiliser pour ce projet 420 souris correspondant à des groupes de 10 animaux par souche (7 souches) et par voie d'injection, (iv et vn) et les expériences seront réalisées en triplicate. Dans un souci de réduction, en fonction de la reproductibilité des résultats obtenus lors des deux premières expériences d'infection, on pourra envisager de s'arrêter après celles-ci et le nombre d'animaux serait ainsi réduit à 280. De même, dans un souci de raffinement, les souris seront hébergées dans un environnement enrichi (igloo et tiges en papier), à raison de 5 souris par

cage, conformément aux conditions de l'arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles NOR : AGRG1238753A. Les résultats de nos expériences antérieures sur le modèle d'infection chez la souris font que nous n'attendons pas de douleur ou de souffrance sévère des animaux dans les conditions expérimentales décrites. Cependant, ceux-ci seront surveillés quotidiennement par le personnel animalier d'une part, et à chaque manipulation par les personnes en charge du projet, d'autre part.

3131. Certaines molécules rentrant dans la composition des emballages plastiques destinés au contact alimentaire sont capables de migrer depuis l'emballage jusque dans l'aliment. Ces molécules sont donc des contaminants alimentaires dont il est important de connaître les risques liés à une exposition régulière, en particulier lors d'expositions in utero ou juste après la naissance.

Le but d'une étude de métabolisme est d'identifier les différents métabolites (terminaux et intermédiaires) après la biotransformation dans l'organisme de la molécule parente et de caractériser une potentielle toxicité des métabolites. En effet, certains métabolites issus de la biotransformations du composé parent se sont révélés plus toxiques et avec des effets biologiques plus nocifs que la molécule parente. Ces études de métabolisme doivent être menées dans le but de fournir aux instances réglementaires les données nécessaires pour la caractérisation du danger et à l'évaluation du risque de ces molécules. Ces études de métabolisme doivent être réalisées chez l'animal de laboratoire afin de disposer d'un modèle complet avec toutes les influences hormonales, nerveuses et sanguines qu'il est impossible de considérer sur des modèles cellulaires. En revanche, les études de métabolisme ne nécessitent que très peu d'animaux (N=4 au maximum), ce qui participe à la réduction du nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales. Les doses choisies sont faibles pour se placer dans un contexte de contamination alimentaire, et n'entraîneront donc pas de douleur ni d'inconfort aux animaux. L'expérimentation ne provoque aucune douleur pour les animaux, qui seront hébergés dans des conditions de tranquillité, en respectant une période d'acclimatation avec un environnement enrichi (roue d'exercice...) et seront surveillés quotidiennement.

Afin d'identifier les différences de métabolisation, cette étude sera réalisée chez le rat mâle, chez la rate adulte, la rate gestante (en fin de gestation) et la rate allaitante, ainsi que les fœtus et nouveau-nés. Tous les organes des animaux seront disséqués, et les urines et fèces de 24h seront collectées en continu de façon à réaliser un bilan métabolique et étudier la distribution du xénobiotique choisi et/ou de ses métabolites dans l'organisme. Les fœtus des femelles gestantes et les nouveau-nés seront également disséqués de façon à identifier un passage transplacentaire de la molécule parente et/ou de ses métabolites, et un passage dans le lait chez le nouveau-né. L'identification des métabolites majeurs sera également réalisée.

3132. La transplantation est la solution thérapeutique lors d'une perte (totale ou partielle) de la fonction rénale. L'amélioration des traitements permet un maintien à long terme du greffon. Cependant, certaines populations lymphocytaires T CD8 (LTCD8) mémoires s'accumulent chez les patients qui développent un rejet chronique et donc « échappent » aux immunosuppresseurs. Nous avons étudié in vitro ces LTCD8 et avons mis en évidence qu'elles utilisaient des voies métaboliques différentes. Ces voies peuvent être inhibées par des drogues prescrites actuellement dans d'autres contextes cliniques

Notre étude vise à définir la pathogénicité ou non de ces populations lymphocytaires particulières puis à évaluer les conséquences du blocage de certaine voie métaboliques sur leur agressivité.

Dans cette saisine, la règle des 3R sera de la façon suivante :

- Remplacer: Les études in vitro ont mis en évidence que ces cellules CD8 mémoires s'activent plus rapidement que des cellules naïves du fait de leur métabolisme particulier. Le passage aux modèles in vivo est indispensable pour valider leur pathogénicité et évaluer l'efficacité de nouvelles approches pour les contrôler.
- Réduire : Puisqu'il n'existe pas d'autres modèles pour valider la pathogénicité de ces cellules dans le cas de la GVHD et/ou du rejet de greffe, les données issues de ce projet devront donc être suffisamment robustes (c'est-à-dire validées avec tests statistiques). Nous utiliserons des tests statistiques non paramétriques (Test de Mann-Whitney) car nous ne pourrions pas nous assurer d'une distribution normale ( $n < 30$ ). Nombre total d'animaux = 460
- Raffiner : Les animaux seront suivis quotidiennement lorsque les cellules humaines seront injectées et les signes cliniques notables et sévères décrits dans le tableau en annexe de cette saisine seront notés. Lorsque deux signes cliniques notables seront présents alors il sera administré deux fois par jour une dose de morphinique (buprénorphine 0.05mg/kg en sous cutané), puis lorsque 3 signes cliniques notables ou un seul signe clinique sévère seront notés alors les animaux seront sortis du protocole et euthanasiés. Tous les animaux seront analysés post-mortem avec des prélèvements d'organes en vue d'études immunohistochimiques ou histologiques permettant de caractériser au mieux la pathogénicité des CD8 et l'effet du control de leur métabolisme.

3133. L'adénovirus de l'entérite hémorragique de la dinde est un virus largement répandu en France et dans le monde, qui infecte la dinde, son espèce-cible, ainsi que le poulet, le faisan, la pintade et la perdrix. Ce virus conduit la plupart du temps à une immunodépression des animaux favorisant les infections bactériennes ou virologiques et dans une minorité de cas à la mort soudaine des animaux. Dans un souci de bien-être des volailles en élevage et pour des raisons économiques, les méthodes de diagnostic sérologique de la maladie (utilisation du sérum pour établir le diagnostic de la maladie) et la vaccination contre l'entérite hémorragique sont donc nécessaires. Le virus se répliquant très mal en culture cellulaire, ce support ne permet pas de récolter des quantités de virus suffisantes pour produire l'antigène nécessaire pour le diagnostic

sérologique. Le recours à l'expérimentation animale, et en particulier à la dinde qui est l'espèce cible, est donc nécessaire pour produire les antigènes inactivés nécessaires au diagnostic. Le laboratoire demandeur a récemment reproduit un stock de réactifs (antigène et antisérum) pour les utiliser dans le contrôle sérologique de ses propres troupeaux mais aussi pour les laboratoires vétérinaires français de diagnostic et doit maintenant valider l'inactivation du stock d'antigène viral.

L'expérimentation proposée, effectuée sur un total de 20 animaux, vise à administrer expérimentalement, par voie orale, à 6 dindonneaux âgés de 6 semaines et maintenus en animalerie confinée, de l'antigène viral dont on veut vérifier l'inactivation. Les rates (organe cible dans lequel se réplique le virus) seront récoltées chez 4 des 6 dindonneaux inoculés, broyées puis administrées à 6 dindonneaux, dont les rates, pour 4 d'entre eux, seront également prélevées après inoculation. Six dindonneaux non inoculés, ainsi que les 4 animaux non sacrifiés après inoculation seront maintenus ensemble jusqu'à 9 semaines d'âge. Ces 10 dindonneaux ainsi que deux animaux-témoins, qui auront été hébergés à part des animaux inoculés, seront euthanasiés et leur sang récolté pour vérifier l'absence d'anticorps spécifiques du virus, signe que le virus a effectivement été inactivé et ne leur a pas été transmis par les animaux inoculés. Dans un souci de réduction, le nombre d'animaux utilisés est le plus faible possible pour permettre la mise en évidence d'une inactivation du virus. Un point-limite, au-delà duquel une euthanasie compassionnelle sera pratiquée, est par ailleurs défini afin de limiter la souffrance des animaux.

3134. La recherche de nouvelles approches thérapeutiques dans le domaine de la cancérologie est un des axes de recherche de notre équipe.

Nous développons différents adjuvants afin de stimuler le système immunitaire lors de protocole d'immunothérapie. Ces adjuvants, après avoir été étudiés et sélectionnés dans des modèles cellulaires *in vitro*, doivent être évalués *in vivo* dans un modèle murin.

L'usage d'un modèle *in vivo* à ce niveau de notre recherche est indispensable afin d'évaluer l'effet de nos adjuvants lors d'une administration en *intra tumoral*. La complexité d'un organisme entier peut entraîner des modifications sur les effets évalués *in vitro*. La mise en place de ce projet permettra ainsi d'évaluer son effet thérapeutique sur la tumeur mais aussi les potentiels effets secondaires avant de pouvoir envisager l'usage de ces systèmes chez l'homme.

-C'est pourquoi nous désirons tester nos adjuvants sur un modèle de référence souvent publié dans ce type d'étude. Le modèle 4T1 est un modèle syngénique de tumeur mammaire chez la souris Balb/c. Il consiste à greffer des cellules tumorales mammaires issues de souris Balb /c dans le tissu mammaire de souris de souche Balb/c, c'est à dire à injecter ces cellules tumorales dans le 4eme bourgeon mammaire droit et/ou gauche.

En se basant sur la littérature, l'adjuvant sera injecté en *intratumoral* ou en systémique à raison de 2 injections par semaine et l'évolution de la tumeur sera mesurée.

Ce projet utilisera 100 à 200 souris. Le projet est divisé en 3 étapes, les étapes 2 et 3 se feront en fonction des résultats obtenus aux étapes précédentes. Si aucune formulation testée dans l'étape 1 n'est efficace, le projet est arrêté et seulement 100 souris seront utilisées.

Afin de répondre à la règle des 3 R, les souris sont suivies quotidiennement selon une grille de score permettant d'évaluer le degré de douleur et d'y remédier avec un traitement analgésique approprié. L'apport de l'imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés et de mieux évaluer l'état d'envahissement tumoral. Afin de limiter le nombre d'animaux, seuls 4 adjuvants ont été sélectionnés et seront évalués en parallèle avec le même groupe contrôle. Par ailleurs les souris sont groupées à 5 par cage avec des petits morceaux de papiers leur permettant de faire un nid.

3135. Notre projet de recherche est focalisé sur les pathologies pancréatiques et particulièrement sur le cancer du pancréas. Il n'existe aucune thérapie curative efficace de ce cancer rare très invasif et chimiorésistant. La mécanistique de signalisation cellulaire peut être analysée dans des lignées cellulaires pancréatiques cancéreuses mais l'environnement de ce cancer, l'hétérogénéité cellulaire *intra-tumorale* qui le caractérise, le système immunitaire de l'hôte, l'environnement au sens large et la réponse au traitement ne peut être reproduite que par l'utilisation de modèles animaux.

Des souris génétiquement modifiées mimant fidèlement la pathologie humaine ont été créées il y a 10 ans. Ces modèles murins de référence sont actuellement les outils de base les plus pertinents pour comprendre la mécanistique de cette pathologie, connaître les facteurs qui en augmentent l'incidence et leur mode d'action, dépister (diagnostiquer) de façon précoce, tester des thérapies ciblées et identifier des marqueurs moléculaires prédictifs de l'efficacité d'un traitement. Ces souris sont maintenant utilisées par l'ensemble des chercheurs du domaine et les publications s'y référant sont nombreuses. La cinétique d'initiation et de progression du cancer dans ces modèles murins est connue. En conséquence, les étapes clés des protocoles expérimentaux sont déjà définies ce qui permet de restreindre les quantités de souris utilisées. Les méthodologies d'investigation *in vivo* sont également décrites dans la littérature limitant ainsi le nombre d'animaux nécessaires aux tests préliminaires. De plus, l'utilisation de ces modèles par d'autres équipes permet le partage des données et des échantillons ce qui facilite l'utilisation raisonnée des souris. Notre pratique et notre retour d'expérience font que nous connaissons l'effectif maximum nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Il est au maximum de 20 souris par condition expérimentale. Pour réduire les expérimentations animales, nous créerons des lignées cellulaires à partir de fibroblastes embryonnaires murins et des tumeurs issues des animaux génétiquement modifiés.

Les xénogreffes chez la souris immunodéficiente ou immunocompétente seront, pour des raisons d'accessibilité, de coût et de réduction du nombre d'animaux, l'outil de prédilection pour les tests pré-cliniques. Les cohortes sont de 8 souris maximum par condition. Nous utiliserons aussi des hamsters pour le suivi qualité d'un produit utilisé en thérapie (essai clinique). Au total 4000 animaux seront utilisés.

Les procédures expérimentales du projet (chirurgie, injection d'agents pharmacologiques ou de contraste, modification de l'environnement) seront réalisées par des personnes habilitées et formées. Les animaux seront hébergés selon les normes en vigueur, leurs conditions d'hébergement et l'enrichissement de leur environnement seront validés par la cellule bien-être. La douleur ou l'état de stress seront évalués lors du suivi quotidien du comportement des animaux. Si nécessaire l'animal sera soulagé par un analgésique dont le type et la dose seront définis en fonction des paliers de douleur. La perte de poids supérieure à 20%, l'arrêt de l'alimentation, la baisse de la température corporelle ou un mutisme durant plus de 24h, la présence d'une masse tumorale ou de métastases > 10mm de côté conduiront à l'arrêt de l'expérimentation et à la mise à mort de l'animal.

3136. Ce projet de recherches en neurosciences vise à étudier le fonctionnement du cortex cérébral, cette structure située à la surface de notre cerveau, communément appelée "matière grise", et bien connue pour son implication dans les fonctions cognitives les plus complexes telles que le raisonnement ou le langage. Le cortex cérébral est un acteur essentiel de nos interactions avec notre environnement et ce projet s'intéresse plus particulièrement à son rôle dans la perception sensorielle. Pour cela il est essentiel de travailler avec un modèle "in vivo" qui autorise l'expérimentateur à délivrer des stimuli sensoriels, mais aussi à suivre, en temps réel, l'activité neuronale au sein du cortex cérébral.

Les seules approches expérimentales permettant d'approcher ces conditions sans faire appel à l'expérimentation animale sont les enregistrements de type EEG (électroencéphalogramme), IRMf (imagerie par résonance magnétique nucléaire fonctionnelle) ou TEP (tomographie par émission de positons) chez l'homme. Ces méthodes sont largement utilisées dans le cadre d'études cliniques, cependant, elles souffrent d'une grande limitation en terme de résolution spatiale (EEG) ou temporelle (IRMf, TEP). Aujourd'hui, une des méthodes les plus puissantes permettant de suivre l'activité neuronale au sein du cortex en temps réel avec une excellente résolution spatiale est l'imagerie sensible au potentiel qui est basée sur l'utilisation de sondes chimiques dont la fluorescence dépend directement de l'activité des neurones. Cependant, elle nécessite d'ouvrir le crâne pour permettre le marquage du cortex avec une sonde fluorescente. Il serait donc inimaginable d'effectuer de telles expériences chez l'homme à des fins expérimentales.

Du fait de sa remarquable organisation topographique, la voie sensorielle allant des vibrisses de la souris à la région du cortex cérébral dédiée au traitement des informations tactiles (encore appelée cortex somatosensoriel primaire (S1)) est un modèle de choix pour étudier le traitement cortical de l'information sensorielle tactile. Au niveau de S1, on peut distinguer l'arrangement d'unités fonctionnelles qui sont organisées de la même manière que les vibrisses sur le museau de l'animal, chacune traitant principalement l'information provenant de la vibrisse qui lui correspond. La manière dont l'information sensorielle tactile est transmise depuis les vibrisses jusqu'au cortex S1 a été largement étudiée. Nous avons donc choisi la souris pour modèle d'étude sachant qu'elle se prête particulièrement bien à l'utilisation des méthodes les plus sophistiquées des neurosciences modernes (telles que l'imagerie sensible au potentiel ou l'optogénétique qui permet d'activer ou d'inhiber des populations neuronales choisies par exposition à la lumière).

Nous proposons ici d'étudier de nombreux aspects fonctionnels qui restent à élucider, notamment concernant la perception d'objets complexes et la manière dont le cortex est susceptible d'extraire les propriétés globales d'un objet. Nous nous intéressons également à la capacité du cortex à associer une information sensorielle donnée avec son contexte. Enfin, il a été démontré que de l'activation neuronale induite par des stimulations tactiles au niveau du cortex cérébral dépend fortement du comportement de l'animal. Cette modulation de la réactivité du cortex est très probablement liée à la libération d'une substance neuromodulatrice appelée acétylcholine, connue pour être impliquée dans les phénomènes d'éveil et d'attention. Nous souhaitons étudier plus précisément le l'impact de la libération d'acétylcholine dans le cortex sur les réponses à des stimulations tactiles.

Ce projet, se découpe donc en 3 axes (sur 5 ans) :

- 1- Le traitement cortical de stimuli tactiles complexes (200 souris).
- 2- La réactivation de patterns d'activité corticale induits par des stimuli tactiles complexes (200 souris).
- 3- La modulation cholinergique du traitement cortical de l'information sensorielle tactile (250 souris)

Ces différents aspects seront étudiés chez des souris en bonne santé, de type sauvage ou transgénique (dont les modifications génétiques ne sont pas pathogènes) élevées dans un environnement enrichi. Nous travaillerons d'abord chez la souris anesthésiée, puis chez la souris éveillée, tête fixée ou libre de ses mouvements. En effet, s'il est possible de décrire les dynamiques corticales induites par des stimulations tactiles et leur modulation par l'acétylcholine sous anesthésie, il est également indispensable de les étudier dans des conditions plus physiologiques, chez l'animal éveillé, car il a été démontré que les propriétés intégratives du réseau cortical sont largement dépendantes de l'état de vigilance et de l'activité motrice de l'animal. Afin de limiter la souffrance de chaque souris, elles seront dans ce cas préalablement habituées au poste expérimental et anesthésiées au cours de la chirurgie et du marquage du cortex préalables aux enregistrements. Il est à noter que l'utilisation de l'imagerie sensible au potentiel permet de réduire au maximum le nombre de souris utilisées car elle autorise l'enregistrement simultané de l'activité coordonnée de larges réseaux de neurones et notamment de plusieurs aires corticales, réduisant de ce fait la répétition des enregistrements. Chacune de nos expériences implique des dizaines d'heures de préparation, de chirurgie, d'enregistrement et d'analyse. Aucune souris ne sera incluse dans un tel programme si cela n'est pas strictement nécessaire au projet. Nous évaluons à ce jour notre besoin à 650 souris au total sur 5 ans, mais ferons tout notre possible pour diminuer ce nombre.

3137. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est devenue un outil puissant pour visualiser de façon non invasive la structure et les fonctions du cerveau chez l'animal et chez l'homme. Des études récentes ont montré que l'activité neuronale,



associée à des changements structuraux tels que le gonflement cellulaire, entraîne une variation de la diffusivité de la molécule d'eau, elle-même détectable par IRM de diffusion (IRMD). L'association des techniques d'IRM fonctionnelle et de la mesure de la diffusion de l'eau est appelée IRM fonctionnelle de diffusion (IRMfD). En outre, le coefficient de diffusion apparent (CDA), qui peut être calculé à partir du signal d'IRMf, est une mesure directe de la diffusion de l'eau, et donc de l'activation des neurones.

Lors des expériences d'imagerie fonctionnelle sur les animaux modèles (rongeurs ou primates), une anesthésie est nécessaire pour éviter les mouvements ou l'angoisse. Des mécanismes de l'action de l'anesthésie ont été proposés par de nombreux chercheurs. Plusieurs régions du cerveau, telles que le cortex cérébral, le thalamus, l'hypothalamus, le cerveau antérieur basal et le mésencéphale, sont impliquées dans ce processus. Cependant, la région responsable du passage de l'état anesthésié à l'état éveillé n'est pas encore clairement identifiée.

Le but de cette étude est donc d'identifier la région cérébrale liée au réveil après anesthésie. La technique d'IRMfD s'impose pour étudier l'action d'un agent anesthésique sur le cerveau. Après l'acquisition IRM, les régions cérébrales candidates seront identifiées. Dans un deuxième temps, elles seront stimulées par voie électro-mécanique (électrique, thermique et osmotique) chez des animaux anesthésiés pour confirmer qu'elles sont bien impliquées dans le réveil. Deux types d'agents anesthésiques seront utilisés : l'isoflurane (anesthésique) et la médétomidine (sédatif).

Aucun dispositif in vitro ni modèle informatique ne peut reproduire la complexité du fonctionnement cérébral, en particulier le passage de l'état anesthésié à l'éveil. Ce projet utilisera des rongeurs modèles, nés en captivité dans des élevages agréés. Leur nombre (136) a été réduit au minimum nécessaire pour détecter un effet statistique suffisant. De plus, pour chaque condition, si aucun effet par stimulation électrique, thermique ou osmotique de la région candidate n'est observé sur les 2 premiers animaux étudiés, cette méthode sera retirée de l'étude.

Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre un traitement approprié ou décider de l'euthanasie. Les animaux sont hébergés selon les règles en vigueur dans l'animalerie incluant un enrichissement de milieu, fourni aux animaux pour améliorer leur bien-être.

L'objectif de ce travail est et de caractériser les mécanismes physiopathologiques impliqués dans une maladie rare, l'holoprosencéphalie, afin d'en améliorer le diagnostic. Cette pathologie possède un mode de transmission complexe et implique le développement embryonnaire du cerveau à un stade précoce.

Notre projet nécessite le recours à la souris comme modèle vertébré pour produire des embryons. Ces embryons sont ensuite utilisés pour réaliser de l'expression de gène et valider de nouveaux gènes candidats pour la pathologie.

La procédure qui justifie cette demande d'autorisation est l'injection intrapéritonéale de Tamoxifène à des femelles de souris gestantes pour obtenir un modèle animal de la pathologie. Le nombre d'individus utilisés sera de l'ordre d'une centaine par an. Le Tamoxifène pourrait produire des effets secondaires (anomalies vaisseaux sanguins conduisant à des hémorragies). Ces effets apparaissent plusieurs jours après le traitement, alors que nos souris sont sacrifiées dans les 3 jours qui suivent l'injection.

Ce projet respecte la règle des 3R :

Une première étude a été réalisée sur des œufs de poulet fécondés. Ce qui nous a permis d'obtenir des résultats préliminaires chez le modèle vertébré sans engager de souffrance aux animaux (raffiner). Nous pouvons ainsi mieux cibler nos recherches sur l'embryon de souris et ainsi utiliser le plus petit nombre d'animaux possible (réduire). L'étude du développement embryonnaire nécessite l'utilisation d'animaux. Il est impossible d'obtenir un embryon in vitro. Le développement du cerveau étant très conservé entre les mammifères, le modèle murin est un modèle de choix pour étudier la physiopathologie de l'HPE (remplacer).

3138. 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. Ce modèle de référence permet d'obtenir, de façon reproductible, chez la souris ainsi traitée toutes les manifestations caractéristiques du phénotype asthmatique. L'utilisation de ce modèle présente un intérêt important, en effet l'allergie à l'ovalbumine constitue la part la plus importante des allergies à l'œuf chez l'Homme adulte, faisant de cet allergène un candidat de choix dans le cadre de l'étude basale des mécanismes immunopathologiques de l'asthme allergique. Obtenus après 3 sensibilisations intra-péritonéales, suivies de 3 challenges intranasaux d'ovalbumine, les résultats montrent que la stimulation bronchique par l'allergène induit une augmentation de la résistance des tissus pulmonaires, une hyperréactivité bronchique, un afflux pulmonaire de cellules inflammatoires et une augmentation du taux sérique d'immunoglobulines E spécifiques. Bien que ce modèle soit nécessaire et pertinent dans le cadre de notre étude, 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 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 2 challenges 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) et une hyperréactivité des voies aériennes. 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'hyper réactivité bronchique à l'exacerbation de l'hyperréactivité bronchique. Ces deux modèles pourront aussi être utilisés afin de tester de nouvelles thérapeutiques. L'utilisation de ces modèles 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 1600 souris sur 5 ans. Il n'existe actuellement aucun modèle d'asthme allergique 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).

3139. Les gliomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes. Parmi les gliomes, les glioblastomes multiformes (GBM) constituent la forme la plus agressive chez l'adulte. La survie à 5 ans des patients atteints de GBM est inférieure à 3% et leur médiane de survie est d'environ 15 mois. Ainsi, les GBM sont des tumeurs qui demeurent incurables et ce, en dépit d'un traitement conventionnel associant la résection chirurgicale, la chimio- et la radiothérapie. Ce constat clinique soulève la nécessité d'optimiser ces stratégies thérapeutiques. Plusieurs travaux ont mis en évidence une augmentation de l'expression d'une protéine, la betaIII-tubuline (betaIII-t) dans les gliomes et cette augmentation serait liée à l'hypoxie (baisse d'oxygène) au sein de la tumeur. L'ensemble des données de la littérature suggère que le niveau d'expression de la betaIII-t pourrait déterminer à la fois le degré d'agressivité des tumeurs gliales mais également leur résistance aux traitements, en particulier la chimiothérapie. Nous avons donc modifié génétiquement des cellules de GBM afin d'inhiber l'expression de la betaIII-t et des expériences in vitro montrent que ces cellules ont une vitesse de prolifération réduite.

L'objectif du projet présenté ici est d'étudier le comportement de ces cellules modifiées génétiquement en condition in vivo. Ce projet est réalisé à la suite de premiers résultats obtenus in vitro sur différents modèles de cultures cellulaires. Nous avons ainsi sélectionné trois lignées de GBM (GL15, U87MG et U251MG) pour les études chez l'animal. Nous envisageons d'utiliser un modèle d'implantation de cellules tumorales humaines dans le cerveau de souris Nude (dépourvues d'immunité) pour éviter le rejet des cellules implantées. Nous suivrons par IRM l'évolution dans le temps du volume tumoral en fonction du niveau d'expression de la betaIII-t des cellules implantées. Dans un deuxième temps, nous étudierons l'effet d'une inhibition de l'expression de la betaIII-t sur la réponse à la chimiothérapie ou à la radiothérapie (rayons X) sur les mêmes cellules de GBM implantées chez les souris.

Dans nos protocoles, tous les moyens sont mis en œuvre pour limiter la souffrance animale. En préopératoire et lors de la chirurgie, les animaux sont anesthésiés avec l'isoflurane (5% en induction; 2,5% en maintien). Cet anesthésique a été retenu car il présente le moins d'effets sur le taux tissulaire d'oxygène. Une anesthésie locale est appliquée au niveau de la suture cutanée (xylocaïne 2%). Au réveil, l'analgésie est assurée par injection de buprénorphine (Buprecare® 0.05mg/Kg, sc.). Une surveillance post-opératoire avec pesée est effectuée quotidiennement pour les animaux avec tumeurs. Si la souffrance de l'animal ne peut être réduite, il sera euthanasié sous 100% de CO<sub>2</sub> ou overdose d'isoflurane (5%). Lors des examens d'imagerie (IRM) ou lors des irradiations, les animaux sont anesthésiés de la même manière.

3140. L'hypoxie néonatale est provoquée par un manque d'oxygène dans le cerveau du nouveau-né avant, pendant ou après l'accouchement. Cette condition crée des dommages au cerveau et peut parfois entraîner la mort du nouveau-né. Si le nouveau-né est traité juste après la naissance et que ce manque d'oxygène est rapidement pallié, un rétablissement complet peut être observé. Malheureusement, les dommages causés par l'hypoxie sont souvent irréversibles et entraînent des complications telles que handicap, retard mental, ou d'autres pathologies cérébrales.

Le but de ce projet scientifique est de déterminer le rôle neuroprotecteur du lactate et du resveratrol sur le cerveau souffrant d'hypoxie.

Notre objectif est d'établir les doses pharmacologiques des molécules montrant une neuroprotection ainsi que leur fenêtre d'action, pour envisager un transfert vers la clinique, et d'éclaircir les voies mises en jeu lors de cette neuroprotection.

Cette étude est menée sur un modèle d'hypoxie-ischémie néonatale chez le rat, largement décrit dans la littérature, entraînant une lésion cantonnée à un hémisphère cérébral. Notre projet nécessitant le fonctionnement du cerveau dans son intégrité afin de tester l'effet neuroprotecteur des molécules et de pouvoir envisager une application clinique rapide, le modèle d'hypoxie-ischémie du nouveau-né ne peut être reproduit que chez l'animal.

L'évaluation de la neuroprotection grâce à l'imagerie par résonance magnétique permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires à ce projet. De même, les mâles et femelles de chaque portée sont inclus dans l'étude. Ainsi, un nombre maximal de 450 animaux sera utilisé pour ce projet.

L'IRM permettant un suivi non-invasif de la lésion, en cas de dommages supérieurs à 50% du volume cérébral, les animaux seront exclus de l'étude et mis-à-mort rapidement dès 3h après l'intervention chirurgicale afin de prévenir toute souffrance. De plus, une surveillance régulière des animaux est mise en place tout au long de la procédure afin de pouvoir réagir rapidement lorsque l'animal présente un état non-satisfaisant comme une perte de poids supérieure à 15%, des difficultés à s'alimenter ou encore des troubles de la motricité. La douleur pourra ainsi être rapidement soulagée par administration d'antalgique ou par mise à mort l'animal.

3141. Dans la majorité des troupeaux ovins, on trouve des agneaux orphelins ou délaissés par leur mère ainsi que de nombreuses brebis prolifiques dont la lactation ne suffit pas pour nourrir la trop nombreuse portée. La solution la plus

économique consisterait à faire adopter ces agneaux par d'autres brebis mais elle est difficile à mettre en place car les brebis refusent d'allaiter un agneau qui n'est pas le leur, à moins qu'il s'agisse d'un nouveau-né dont l'adoption s'effectue immédiatement à la mise bas. Ainsi, dans les élevages ovins, l'allaitement artificiel est la solution de rigueur, les éleveurs remplaçant le lait de la mère par un aliment commercial distribué aux agneaux au moyen d'un nourrisseur. De toute évidence, le principal avantage de l'allaitement artificiel est la possibilité de sauver des agneaux qui autrement sont voués à la mort. Malgré cela, l'allaitement artificiel n'offre pas des gages de satisfaction suffisants: atelier demandant beaucoup d'attention mais parfois négligé car trop chronophage, agneaux chétifs, croissance décevante, diarrhée fréquente, mortalité plus élevée que chez les agneaux laissés avec leur mère. Récemment la filière a soulevé un problème de mortalité importante (40-80%) et parfois tardive (à 3 semaines d'âge) depuis 10-15 ans sans que les raisons en soient connues.

Les probiotiques sont, selon la définition de la FAO et de l'OMS, des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels.

L'objectif du présent projet est d'améliorer les facteurs nutritionnels jusqu'au post-sevrage en apportant des probiotiques dans l'alimentation visant à optimiser l'implantation des populations microbiennes dans le tube digestif. En effet, la colonisation microbienne du tractus digestif chez le jeune agneau représente une étape clé du développement de la fonctionnalité du rumen. La mortalité d'agneaux à l'âge d'un mois de pathologies vraisemblablement digestives laisse suspecter un problème de déséquilibre au niveau de la flore bactérienne, causant à la fois des problèmes de santé et de comportement. L'apport de probiotiques semble prometteur pour compenser le déséquilibre de la flore bactérienne. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthodes in vitro permettant de tester ces effets.

Aussi, l'impact de cette supplémentation en probiotiques au cours des 50 premiers jours sera étudié, chez des agneaux sur le long terme, par des mesures zootechniques, comportementales, microbiologiques (flore commensale et espèces pathogènes) et de stress oxydant.

De plus nous étudierons la capacité de réponse de ces agneaux à différents challenges (challenge vaccinal, challenge parasitaire) comme ceux qu'ils peuvent rencontrer dans les conditions d'élevage classiques. Cette capacité de réponse sera comparée entre lots recevant ou non des probiotiques dans le jeune âge.

Au cours de cet essai, 48 agneaux seront conduits en 3 traitements impliquant chacun 16 agneaux, nombre minimum pour pouvoir obtenir des données statistiquement fiables et interprétables tout en prenant en compte la perte possible d'agneaux constatée fréquemment dans ce type de système et en respectant le bien-être animal. Dans chaque traitement, les 16 agneaux seront répartis en 2 cases de 8 pour tenir compte à la fois de la grégarité de cette espèce et éviter la confusion traitement et case. Les agneaux seront préalablement habitués à la contention nécessaire aux prélèvements sanguins réalisés par des personnels formés et compétents.

Remplacement : l'étude ne peut pas être conduite sur des modèles informatiques, ni des invertébrés ou cellules animales.

Réduction : L'effectif d'agneaux par traitement a été défini de façon à obtenir des données suffisantes sur des indicateurs très divers (performances, comportement, santé et immunité, microbiote digestif, données transcriptomiques) permettant de répondre à la question de recherche dans le cadre d'un projet sur la gestion intégrée de la santé des animaux.

Raffinement : les agneaux qui sont des animaux sociaux grégaires sont conduits en lots stables de taille suffisante. L'environnement physique tient compte des besoins en lien avec l'âge (température, type d'alimentation...). Une habitude aux prises de sang est mise en place dès le jeune âge pour limiter le stress lié à cette contention particulière. En dehors du challenge parasitaire, la collecte des fèces est réalisée par un système non invasif (pas de prélèvement intra rectal). Un suivi régulier de l'état sanitaire est réalisé afin de prévenir les pathologies.

3142. L'hémophilie est une maladie de la coagulation sanguine caractérisée par un déficit d'un facteur de la coagulation. Ce déficit peut être dû à une mutation génétique ou à la présence d'anticorps contre l'un de ces facteurs. Les manifestations cliniques de la maladie sont proportionnelles au déficit et correspondent à des hémorragies pouvant atteindre différents organes. Il existe plusieurs types d'hémophilie selon le facteur de coagulation déficitaire : les plus communes, même si elles sont considérées comme des maladies rares, sont l'hémophilie A (déficience en facteur VIII) et l'hémophilie B (déficience en facteur IX).

L'objectif de ce projet est d'étudier le profil pharmacocinétique de facteurs de la coagulation humains après administration unique par injection.

La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'un médicament dans l'organisme, afin de :

- Sélectionner les formulations maintenant le médicament le plus longtemps dans l'organisme.
- Sélectionner le médicament candidat restant le plus longtemps en circulation.
- Lors d'un changement de procédé de fabrication, s'assurer que ce changement n'a pas d'impact sur la pharmacocinétique du médicament.
- Sélectionner la meilleure voie d'administration.
- Adapter les posologies de traitement aussi bien dans les modèles d'efficacité chez l'animal que dans les essais cliniques chez l'homme.

Les études de pharmacocinétique sont réglementairement requises et indispensables avant l'utilisation d'une nouvelle molécule dans un essai clinique chez l'homme. Dans ce projet, la nouvelle molécule est administrée par voie intraveineuse, sous-cutanée, intrapéritonéale ou intramusculaire et des prélèvements sont effectués à différents temps afin de déterminer la concentration sanguine de la molécule au cours de temps. Cette cinétique permet de déterminer le temps de circulation de la molécule, la concentration maximale, le temps d'exposition total de l'organisme à la molécule, etc...

Ces expériences ne peuvent pas être menées in vitro ou sur des modèles informatiques. Seul un animal vivant possède tous les compartiments d'absorption, distribution, métabolisme et élimination des molécules. Nous utiliserons un modèle de rongeurs hémophiles B. Ces rongeurs, déficients pour le facteur de la coagulation IX, manifestent une expression des gènes caractéristique d'une hémophilie B sévère chez l'homme. Ils présentent un temps de saignement plus prolongé que les rongeurs sauvages et sont couramment utilisés pour évaluer l'efficacité de différents facteurs de la coagulation.

Nous utiliserons au maximum 1350 animaux sur 5 ans, nés et élevés dans des établissements agréés. Ce nombre a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Des méthodes d'anesthésie sont pratiquées avant chaque injection ou prélèvement afin d'éviter les souffrances. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir leur bien-être. Dans le cas où des effets indésirables interviendraient, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de procéder à une euthanasie.

3143. Les maladies parodontales, qui touchent le parodonte c'est à dire les tissus de soutien de la dent, entraînent une réduction de l'os de soutien (os alvéolaire) et de la gencive (« déchaussement » des dents) et conduisent à la perte des dents en cas d'absence de traitement.

De même, l'extraction de dents entraîne également cette réduction de l'os de soutien et de la gencive. Cette perte osseuse peut avoir un effet négatif sur le résultat de thérapies ultérieures destinées à restaurer la dentition perdue. Par exemple, cela peut rendre difficile le positionnement d'un implant et ainsi compromettre cette restauration. Afin de remédier à ces pertes potentielles, un certain nombre de techniques visent à préserver l'os de soutien et réduire ainsi la perte osseuse. Il s'agit par exemple de l'utilisation de divers matériaux de greffe osseuse.

Ce projet a pour objectif de suivre l'évolution au cours du temps de substituts de greffe osseuse dans un modèle de défaut osseux créé au niveau du Ramus mandibulaire chez le rat.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable le comportement de substituts de greffe osseuse implantés dans un défaut osseux dans un organisme entier vivant. En effet, le comportement du substitut de greffe osseuse dépend de très nombreux facteurs tels que la zone du défaut, les tissus environnants, l'activité de l'animal, etc.

Le modèle, réalisé chez le rat, est un modèle largement décrit dans la littérature. De plus, il s'agit d'un animal couramment employé en expérimentation animale, permettant ainsi d'une part de gérer plus facilement son bien-être au cours de l'étude et d'autre part de travailler sur des lots homogènes (âge et sexe fixés).

Lors de la réalisation de ce modèle, des méthodes d'anesthésie et d'analgésie seront mises en place (avant, pendant et après la chirurgie) sur chaque animal afin de garantir son état de santé et de bien-être. De plus, afin de prévenir les infections, un traitement antibiotique sera mis en place deux fois par jour, un jour avant et le jour de la chirurgie. Après la chirurgie, les animaux et notamment les plaies opératoires seront observés attentivement deux fois par jour pendant 7 jours minimum puis quotidiennement afin de détecter tout signe clinique anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires rapidement et de façon adéquate (par exemple application d'antiseptiques et/ou antibiotiques en cas d'infection des plaies). Afin de surveiller leur prise de poids, les animaux seront pesés quotidiennement lors du suivi post-opératoire (7 jours) puis une fois par semaine.

Deux phases sont prévues dans ce projet.

Dans un premier temps, le modèle de défaut osseux au niveau du Ramus mandibulaire sera mis en place afin de valider le modèle. Pour cette première étape, un maximum de 18 rats sera utilisé.

Dans un second temps, différents substituts de greffe osseuse seront évalués au cours du temps. Pour cette seconde étape, un maximum de 450 rats sera utilisé permettant d'évaluer l'efficacité des substituts de greffe osseuse testés.

L'évaluation des produits implantés se fera selon trois modalités :

- Histologie et RT-qPCR : Ces techniques permettent de fournir des informations importantes dans le processus de formation de l'os.

- Imagerie par rayon X (CT et/ou  $\mu$ -CT) : Cette technique permet de suivre macroscopiquement et au cours du temps l'évolution des différents composants du défaut. Le recours à cette méthode permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaire car le même animal peut être suivi tout au long de l'étude. Ainsi, il n'est pas nécessaire de prévoir des animaux supplémentaires spécifiques pour cette analyse. De plus, c'est une technique non invasive qui requiert seulement une légère anesthésie des animaux durant l'examen.

3144. Les Rétinopathies Pigmentaires (RP) touchent environ une personne sur 4000 dans les pays occidentaux, et se caractérisent par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet puis à cône, entraînant une diminution progressive de la vision puis une cécité. Aucun traitement efficace n'est disponible à ce jour.

Dans des études antérieures, l'équipe avait identifié que le gène *Nxn1* codait pour 2 formes d'un facteur ayant un rôle protecteur sur les photorécepteurs : le RdCVF « Rod-derived cone viability factor » et RdCVFL (forme longue du RdCVF). Après plusieurs études ayant menés à des résultats concluants sur les effets bénéfiques du RdCVF(L), l'équipe s'engage dans une voie de tests précliniques sur l'animal afin de vérifier la possibilité d'utiliser le RdCVF(L) comme agent thérapeutique.

Dans ce projet, nous proposons de tester l'efficacité thérapeutique de deux produits : le RdCVF seul et du RdCVF+RdCVFL. Ces produits seront injectés en sous rétinien à des souris rd10 (modèle murin de rétinite pigmentaire).

Les effets protecteurs seront évalués à l'aide d'électrorétinogrammes, de tests d'acuité visuelle et d'images de la structure des couches de la rétine. Des études histologiques complémentaires seront réalisées après euthanasie de l'animal.

Dans une demande antérieure, nous avons prévu des groupes d'animaux pour lesquels nous injecterions un seul œil (test d'un produit par animal). Toutefois, du fait qu'il existe une grande inter variabilité du phénotype de la souris rd10, nous

devons ajouter à cette étude 2 groupes de 15 animaux qui recevront simultanément les deux produits (un produit par œil). L'analyse de ces 30 souris rd10 complémentaires est indispensable pour la validité de notre étude préclinique.

Ces expérimentations ne peuvent être réalisées in vitro car il s'agit ici de valider une étude préclinique dans la cadre d'un essai thérapeutique pour la rétinopathie pigmentaire. Les groupes ont été réduits au maximum pour obtenir des résultats statistiquement interprétable et permettant de valider l'objectif scientifique de ce projet. Les conditions d'hébergements seront adaptées au modèle expérimental. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les mesures prises ici respectent le 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

3145. La rétinopathie diabétique est une complication du diabète qui atteint l'œil au niveau de la rétine et serait la première cause de cécité avant 65 ans. Le taux élevé de sucre dans le sang entraîne une détérioration des capillaires sanguins de la rétine. Ils perdent leur étanchéité conduisant à des hémorragies et des exsudats, lésant la rétine. La maladie peut évoluer vers une rétinopathie proliférative avec production anormale de nouveaux vaisseaux peu fonctionnels, des décollements de la rétine et des saignements dans le vitré. Un œdème au niveau de la macula, zone de la rétine responsable de la bonne acuité visuelle, peut survenir à tout moment et entraîner la perte de la vision. Bien que chacun des modèles animaux du diabète ne reproduise pas l'ensemble des signes cliniques de la pathologie humaine, ils permettent de décortiquer les mécanismes impliqués dans la rétinopathie diabétique ou d'étudier de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'objectif du projet est la mise en place, au sein de l'établissement utilisateur, d'un modèle expérimental de rétinopathie diabétique chez le rat et la souris afin de tester l'efficacité de traitements potentiels dans cette maladie. Nous utiliserons pour cela le modèle de diabète induit par injection de streptozotocine chez le rongeur qui est très largement utilisé et bien décrit dans la bibliographie pour l'étude de la rétinopathie associée au diabète. La streptozotocine agit en détruisant les cellules du pancréas qui produisent l'insuline. L'insuline est la seule hormone qui diminue la glycémie, privés de cette hormone, les animaux deviennent diabétiques.

Ce projet nécessitera au maximum sur 5 ans, 1480 rats et 1480 souris, âgés de minimum 6 semaines au début de l'étude.

Afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux, un suivi quotidien des rongeurs sera effectué. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettant de limiter une éventuelle douleur à son minimum. Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages de taille adaptée, un enrichissement est fourni pour améliorer le bien être de l'animal. Ce projet a été soumis et évalué par un comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

3146. Les cellules immunitaires du donneur injectées chez le patient lors de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) peuvent être à l'origine à la fois d'un effet anti-leucémique (GVL : graft versus leukemia) et d'une réaction du greffon contre l'hôte (GVHD : graft versus host disease). Les lymphocytes T (LT) du donneur sont reconnus comme étant les acteurs majeurs de cet effet GVL et de la GVHD. Néanmoins, la nature des LT responsables de la GVL et de la GVHD diffère. La prévention de la GVHD, dépendante du type de greffe et du type de donneur, associe en général de la cyclosporine (inhibiteur de la calcineurine) à un autre agent immunosuppresseur (methotrexate, mycophenolate mofetyl, serum antilymphocytaire). Quand la GVHD aigue ou chronique survient, les corticostéroïdes à fortes doses représentent le traitement de choix pour les patients. Cependant 15% environ des patients sont réfractaires ou dépendants aux corticostéroïdes, définissant la GVH corticorésistante ou corticodépendante. Ces situations nécessitent des traitements de deuxième ligne plus ou moins efficaces responsables en général d'hospitalisations très longues pour les patients (quelques semaines à quelques mois) avec malheureusement parfois une inefficacité conduisant au décès du patient. Dans cette étude nous souhaitons évaluer l'efficacité des différentes molécules ciblant toutes le lymphocyte T pour éviter la GVHD chez la souris.

Dans cette saisine, la règle des 3R sera de la façon suivante :

- Remplacer : Les molécules que nous souhaitons tester in vivo ont déjà été validées in vitro dans des modèles de réaction mixtes lymphocytaires mimant une reconnaissance allogénique. Cependant le passage aux modèles in vivo est indispensable pour définir leur effet sur la prise de greffe.

- Réduire : Puisqu'il n'existe pas d'autres modèles pour valider l'effet anti-GVH tout en mesurant la prise de greffe, les données issues de ce projet devront donc être suffisamment robustes (c'est-à-dire validées avec tests statistiques). Nous utiliserons des tests statistiques non paramétriques (Test de Mann-Whitney) car nous ne pourrions pas nous assurer d'une distribution normale ( $n < 30$ ). Nombre total d'animaux = 360

- Raffiner : Les animaux seront suivis quotidiennement lorsque les cellules humaines seront injectées et les signes cliniques notables et sévères décrits dans le tableau en annexe de cette saisine seront notés. Lorsque deux signes cliniques notables seront présents alors il sera administré deux fois par jour une dose de morphinique (buprénorphine 0.05mg/kg en sous cutané), puis lorsque 3 signes cliniques notables ou un seul signe clinique sévère seront notés alors les animaux seront sortis du protocole et euthanasiés. Tous les animaux seront analysés post-mortem avec des prélèvements d'organes en vue d'études immunohistochimiques ou histologiques permettant de caractériser au mieux l'effet des molécules testées.

3147. Les Rétinopathies Pigmentaires (RP) touchent environ une personne sur 4000 dans les pays occidentaux, et se caractérisent par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet puis à cône, entraînant une diminution progressive de la vision puis une cécité. Aucun traitement efficace n'est disponible à ce jour.

Dans des études antérieures, l'équipe avait identifié que le gène *Nxn1* codait pour 2 formes d'un facteur ayant un rôle protecteur sur les photorécepteurs : le RdCVF « Rod-derived cone viability factor » et RdCVFL (forme longue du RdCVF). Après

plusieurs études ayant menés à des résultats concluants sur les effets bénéfiques du RdCVF(L), l'équipe s'engage dans une voie de tests précliniques sur l'animal afin de vérifier la possibilité d'utiliser le RdCVF(L) comme agent thérapeutique. Dans ce projet, nous proposons de tester l'efficacité thérapeutique du RdCVF(L) en l'injectant via des outils viraux à un modèle murin de rétinite pigmentaire (la souris rd10).

Les effets protecteurs seront évalués à l'aide d'électrorétinogrammes, de tests d'acuité visuelle et d'images de la structure des couches de la rétine. Des études histologiques complémentaires seront réalisées après euthanasie de l'animal.

Au total 215 animaux seront nécessaires à cette étude incluant les contrôles et les différentes doses testées.

Ces expérimentations ne peuvent être réalisées in vitro car il s'agit ici de valider une étude préclinique dans la cadre d'un essai thérapeutique pour la rétinite pigmentaire. Les groupes ont été réduits au maximum pour obtenir des résultats statistiquement interprétable et permettant de valider l'objectif scientifique de ce projet. Les conditions d'hébergements seront adaptées au modèle expérimental. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les mesures prises ici respectent le 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

3148. Dans l'organisme, il existe un lien étroit entre la circulation sanguine et le métabolisme du glucose. Nous souhaitons étudier la rupture de ce lien survenant lors des processus pathologiques. C'est le cas lors de l'infarctus du myocarde: le manque d'apports nutritifs engendré par l'obstruction d'un vaisseau du cœur va conduire à une perturbation du métabolisme qui à terme se traduit par une perte de la fonction contractile cardiaque.

Cette pathologie, qui est l'une des principales cause de décès dans les pays industrialisés, nécessitent une prise en charge précoce pour réduire la perte de la fonction cardiaque.

Le projet de recherche vise, d'une part, à caractériser le lien entre la microcirculation et le métabolisme glucidique lors de l'infarctus du myocarde par deux méthodes d'imagerie médicale.

Le modèle animal choisit est le rat Wistar femelle. 60 animaux seront étudiés pour ce projet, ce qui correspond à trois groupes comprenant 20 animaux.

-Le groupe 1 est un groupe d'ischémie permanente par ligature définitive de la coronaire afin de simuler l'insuffisance cardiaque.

-Le groupe 2 est un groupe d'ischémie transitoire par ligature pendant 30 minutes de la coronaire afin de simuler le prise en charge clinique,

-Le groupe 3 est un groupe contrôle.

Les animaux seront suivis par imagerie au moment de la ligature de la coronaire (J0) afin d'observer les phénomènes précoces de l'obstruction de l'artère, puis à J7, J14 et à 3 mois. Ce suivi se fera avec deux modalités d'imagerie médicales : la scintigraphie afin d'observer la captation du glucose par le cœur, et une méthode d'échographie ultrarapide afin d'observer la fonction contractile du cœur ainsi que ses vaisseaux.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en respectant les règles de statistique. Le comportement des animaux sera surveillé quotidiennement afin de réduire au mieux la souffrance des procédures. Ainsi, une perte de poids ou une léthargie de l'animal seront révélateurs de la douleur et induiront une administration d'un analgésique adapté. En cas de non récupération de l'animal, une mise à mort sera pratiquée. Ces nouvelles explorations fonctionnelles vont permettre de comprendre certains paramètres précoces afin de développer des marqueurs prédictifs. En effet, le suivi non invasif et sur le long terme des animaux s'inscrit dans une optique de réduction du nombre des animaux puisque l'animal sera son propre témoin. Aucune publication ne fait référence au suivi de l'évolution du métabolisme du glucose combiné à la circulation dès la mise en place de l'infarctus du myocarde. In fine, ces deux méthodes d'imagerie seront validées pour une utilisation en recherche pré-clinique.

3149. La transplantation fait actuellement face à différents problèmes: manque d'organes avec des listes croissantes de patients en attente de greffe dont certains meurent avant de se voir proposer un organe. Le rejet à plus ou moins long terme du greffon constitue également un problème. Différents modèles de recherche chez le primate-non-humain (PNH) peuvent mimer parfaitement des situations cliniques connues et permettent ainsi de tester différents protocoles thérapeutiques innovants en conditions précliniques.

L'interaction interleukine 7 (IL7)- IL7 récepteur (IL7-R) est cruciale pour l'homéostasie des lymphocytes T (LT). Comme ces cellules jouent un rôle essentiel dans le rejet du greffon, cette interaction IL7/IL7-R représente une cible thérapeutique potentielle pour la transplantation d'organe, comme ceci a été démontré préalablement chez la souris. Disposant d'une expertise dans le domaine du développement des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique, notre équipe a produit plusieurs anticorps et sélectionné un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'IL7-R ou CD127 humain, à activité antagoniste sur les LT. Ainsi dans ce protocole expérimental, nous proposons d'évaluer l'efficacité de cet anticorps dans l'induction de tolérance immune dans un modèle préclinique d'allo-transplantation rénale chez le PNH.

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude sera de 15 (donneurs et receveurs d'organes compris). Dans un souci de respect de la règle des 3R, les reins d'un même et seul donneur seront greffés simultanément à deux receveurs différents. Les groupes "contrôles" (sans traitements et monothérapie Tacrolimus) ont déjà été réalisés dans des études antérieures et ne seront donc pas refaits. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures de ce projet seront réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure. Les animaux seront hébergés avant protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les individus traités seront hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères.

3150. Les modèles animaux d'inflammation du colon sont indispensables à la compréhension des mécanismes de développement des pathologies inflammatoires du tube digestif, tel que la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique. De nombreux modèles murins de colites ont été développés pour mimer quelques aspects de ces maladies humaines, cependant les rongeurs présentant des différences immunologiques significatives avec l'homme, la translation clinique reste peu prédictive. De plus, le développement pharmacologique d'anticorps monoclonaux (immunothérapie) souffre du manque de cross-réactivité entre le rongeur et l'homme. Ainsi, le projet ici consiste à tester une nouvelle drogue thérapeutique anti-CD127 dans un modèle d'inflammation du colon induit par des lavements intra-rectaux au TNBS (2,4,6- trinitrobenzène sulfonate) chez des primates non-humains (PNH) qui possède un système immunitaire très proche de celui de l'homme. Ce modèle existe déjà chez les souris, rats, porc, ... et sera adapté à la morphologie du colon du primate non-humain. Une partie importante des résultats feront recours à de l'imagerie médicale (endomicroscopie confocale) ce qui permet d'avoir un accès direct au tissu tout en limitant le caractère invasif du modèle. Une évaluation pharmacologique et pharmacodynamique de la drogue sera réalisée en parallèle.

L'interaction interleukine 7 (IL7)- IL7 récepteur (IL7-R) est cruciale pour l'homéostasie des lymphocytes T (LT). Comme ces cellules jouent un rôle essentiel dans les réponses immunes cellulaires et humorales, cette interaction IL7/IL7-R représente une cible thérapeutique potentielle pour la transplantation d'organe et le traitement de diverses pathologies autoimmunes et/ou inflammatoires chroniques, comme ceci a été démontré préalablement chez la souris. Disposant d'une expertise dans le domaine du développement des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique, notre équipe a produit plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre l'IL7-R ou CD127 humain, et retenue le meilleur d'un point de vue activité. L'équipe a par ailleurs démontré que ces anticorps possèdent une cross-réactivité avec les PNH, mais pas avec des espèces plus éloignées de l'homme tel que les rongeurs ou le porc.

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude sera de 10. Dans un souci de respect de la règle des 3R, l'étude de pharmacocinétique/ pharmacodynamique de la molécule sera conduite de façon simultanée au modèle TNBS sur les mêmes animaux. Chaque animal sera son propre contrôle dans l'évaluation de l'effet pharmacodynamique. De plus, de façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures de ce projet seront réalisées chez des animaux sous anesthésie générale et un traitement antalgique leur sera donné de façon adaptée à la procédure. Les animaux sont hébergés avant protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les individus traités seront hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères.

3151. Les troubles cognitifs sont fréquents au cours du vieillissement normal puisqu'il touche jusqu'à 50% des sujets âgés de plus de 55 ans. Les principaux types de troubles cognitifs marqués sont le délire, la démence, la perte d'attention et l'amnésie. Les cas les plus sévères sont associés aux maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la maladie de Huntington où ils constituent un vrai problème socio-économique. A l'heure actuelle, il y a seulement quatre médicaments (donepezil, rivastigmine, galantamine et memantine) reconnus officiellement pour le traitement des troubles de la mémoire, un des processus majeurs de la fonction cognitive dans les maladies neurodégénératives. Les effets de ces molécules restent modestes et elles ne sont pas dénuées d'effets secondaires dont les plus courants sont des troubles gastro-intestinaux. Même si l'origine des troubles de la mémoire demeure inconnue, il est généralement accepté que l'inflammation des tissus nerveux en est une cause probable. De plus, cette inflammation est de plus en plus discutée comme une des origines possibles de la maladie d'Alzheimer et est, dans ce sens, exploitée dans l'élaboration de nouveaux traitements.

Afin de prendre en compte la composante inflammatoire des pathologies dans les modèles d'évaluation de nouvelles molécules thérapeutiques, nous nous proposons de développer un modèle animal de troubles de la mémoire induits par une inflammation du système nerveux.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 18 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Dans le cadre du respect de la règle des 3R, aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. De plus, nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 450 rats et 450 souris est envisagée.

3152. Dans le cerveau, la transmission de l'influx nerveux est facilitée par la présence d'une gaine de myéline qui entoure et isole électriquement les fibres nerveuses. Cette gaine de myéline est progressivement détruite dans les maladies démyélinisantes comme la sclérose en plaques ce qui altère la conduction nerveuse. La remyélinisation des fibres nerveuses qui permet de restaurer la conduction nerveuse est souvent défectueuse dans ces maladies. Il est donc important de comprendre quels sont les mécanismes impliqués dans le processus de remyélinisation, pour l'améliorer et restaurer la transmission de l'influx nerveux.

Aussi, le but de notre projet est de caractériser la contribution d'une famille de protéines membranaires au processus de remyélinisation. Nous avons déjà observé dans des modèles en culture qu'une étape critique de la remyélinisation était réduite en l'absence d'une des protéines d'intérêt. Pour valider ces observations et suivre les différentes phases de la remyélinisation qui ne peuvent pas être reproduites en culture, il est nécessaire de s'appuyer sur des modèles animaux. Nous

utiliserons un protocole bien établi qui mime les événements survenant dans les maladies démyélinisantes. Ce protocole sera appliqué à des souris contrôle et des souris dépourvues des protéines d'intérêt. Pour réduire le stress, les animaux seront maintenus dans leur cage d'hébergement dans un milieu enrichi. Une surveillance quotidienne des souris sera faite pour s'assurer qu'aucune souffrance au-delà du tolérable n'apparaisse. Les animaux seront euthanasiés à l'issue de l'expérimentation selon les bonnes pratiques zootechniques, recommandées par les comités d'éthique en expérimentation animale, et leurs cerveaux prélevés pour pratiquer ex vivo toute une batterie d'analyse

Nous estimons à 216 souris jeunes adultes le nombre minimum d'animaux nécessaires pour réaliser des tests statistiques dans ce projet. 3 catégories d'animaux seront comparées, les animaux contrôle et les animaux dépourvues de deux protéines d'intérêt, soit 72 souris de chaque catégorie. L'impact de l'absence des protéines d'intérêt sur le processus de myélinisation sera analysé par différents tests expérimentaux à trois temps critiques.

3153. Notre projet concerne l'identification des mécanismes cellulaires et moléculaires qui gouvernent les différentes étapes du développement du cortex cérébral : prolifération des cellules souches corticales, migration et différenciation neuronale. La compréhension de ces processus biologiques fondamentaux est un prérequis pour progresser dans l'étiologie des pathologies neurodéveloppementales qui sont à l'origine de troubles invalidants (épilepsie, autisme, schizophrénie, etc.). Si les études sur le tissu humain sont d'une importance théorique et clinique indéniable, les résultats sont souvent difficiles à corréler avec les observations obtenues chez le rongeur où il a été possible d'élucider le rôle de gènes individuels. Par ailleurs, le matériel histologique humain est rare et la préservation des tissus souvent non optimale. Le singe représente un maillon incontournable entre l'homme et le rongeur qui constitue le modèle majeur des approches réductionnistes. Des travaux récents ont en effet montré que certains mécanismes gouvernant le développement du cerveau sont communs au singe et à l'homme mais n'existent pas chez le primate. Un des atouts majeurs du cerveau de singe comme modèle d'étude de la corticogenèse réside également dans le haut niveau de résolution spatiale et temporelle. Alors que la prolifération des neurones corticaux se déroule pendant une période de 7 jours chez la souris, cette période dure 60 jours chez le singe. Une colonie de reproduction de cynomolgus composée de 45 de femelles pubères âgées de 4 à 8 ans et 3 mâles nous permettra d'obtenir 75 fœtus, 45 (9/an) utilisés pour l'étude des précurseurs de la corticogenèse à différents stades embryonnaires (de E35 à E105) et 30 (6/an) utilisés pour des analyses génétiques (RNA-Seq, miRNA-Seq).

Les animaux sont hébergés dans de grandes volières, et inclus dans des groupes sociaux, avec du matériel de fourrage et de multiples formes d'enrichissement (perchoirs, tunnels, cachettes).

Nous entraînons les animaux à coopérer (par renforcement positif) pour certaines procédures comme les frottis quotidiens (qui nous permettent de déterminer le cycle menstruel des femelles) de manière à diminuer le stress de l'animal et pour des actes non invasifs et non douloureux comme les échographies de manière à éviter le recours à l'anesthésie.

Afin de réduire le nombre d'animaux, une même femelle pourra être utilisée pour des gestations successives (entre 2 et 5 gestations). Nous utilisons des tranches organotypiques de cerveaux de fœtus que nous maintenons en culture pendant 8 à 10 jours pour des observations de la prolifération et de la migration en cinétique vidéomicroscopique. Nous avons fait réaliser sur mesure une platine d'observation du microscope biphotonique nous permettant de doubler le nombre de tranches organotypiques observées (48 tranches) et de réaliser entre 5 et 8 conditions expérimentales par cerveau ce qui permet de réduire le nombre de fœtus utilisés d'un tiers.

3154. Un des aspects les moins compris du cerveau humain concerne l'organisation anatomo-fonctionnelle du cortex cingulaire, une région impliquée dans plusieurs pathologies psychiatriques. Il a été suggéré que la modulation de l'activité de cette région était un marqueur potentiel pour l'évaluation de la progression de ces pathologies. Cette région est vaste et contient une multitude de subdivisions mal définies. De plus, les mêmes sous-régions du cortex cingulaire ont été démontrées comme étant impliquées dans des fonctions multiples, rendant sa compréhension extrêmement difficile. Identifier et comprendre le rôle des différentes sous-régions du cortex cingulaire est fondamental pour établir ensuite des marqueurs de leur dysfonctionnement.

A l'heure actuelle, deux aspects fonctionnels du cortex cingulaire ont été clairement démontrés. Tout d'abord, cette région est impliquée dans l'analyse des résultats positifs ou négatifs de nos actions dans les situations d'apprentissage. Ensuite, cette région contient des aires motrices somatotopiquement organisées. Une hypothèse serait que ce sont les aires cingulaires motrices qui analysent les feedback en fonction de leur modalité sensorimotrice (e.g. un feedback alimentaire serait analysé par la représentation motrice cingulaire de la langue). Le but de ce projet est de tester cette hypothèse. Dans ce but, nous effectuerons des études d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) chez le singe. Ainsi, 5 macaques rhésus seront scannés en IRMf pendant qu'ils effectueront différents mouvements (e.g. mouvements de langue, de main, et saccadiques oculaires) et pendant qu'ils effectueront une tâche d'apprentissage par essai-erreur dans laquelle ils devront apprendre les associations entre 2 stimuli visuels et 2 réponses motrices (mouvements de main, mouvements orofaciaux, ou réponse vocale). Cet apprentissage sera guidé par l'obtention de feedback vocaux. Une fois cette cartographie établie, nous effectuerons des études couplant IRMf et inactivations transitoires pour établir le rôle causal de chacune des sous-régions du cortex cingulaire. Ainsi, cette étude permettra de développer un modèle animal des déficits spécifiques de sous-régions du cortex cingulaire. Un effort particulier concernera l'établissement des homologies et différences entre l'homme et le singe afin de permettre un transfert des données invasives obtenues chez le singe directement à l'homme.

Ce projet sera mené en respectant scrupuleusement la règle des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement) préconisée pour une recherche sur l'animal à des fins scientifiques.



Comprendre précisément le rôle causal des différentes sous-parties du cortex cingulaire sur le comportement et le fonctionnement du réseau nécessite inévitablement une expérimentation animale permettant une approche invasive. Nos travaux ne peuvent pas être réalisés grâce à des techniques alternatives comme les cellules en culture ou la simulation informatique car à l'heure actuelle, elles ne permettent pas d'atteindre le niveau de complexité requis pour l'étude des fonctions cognitives.

Le nombre d'animaux est réduit à la valeur minimale permettant d'obtenir des résultats robustes et reproductibles. De plus, chaque animal est testé pour l'ensemble des conditions de l'expérience de façon répétée et constitue son propre contrôle.

Finalement, nous sommes extrêmement attentifs au bien-être de nos animaux et veillons à ce que leurs apprentissages se fassent de manière positive en les récompensant avec des friandises et des jouets. Concernant leur hébergement, les singes sont socialement logés par groupes et ont à disposition de multiples formes d'enrichissement, y compris le matériel de fourrage, des jouets, etc...

3155. Les états de choc sont la principale cause de décès des patients de réanimation. Ils sont à l'origine d'atteintes vasculaires responsables d'un mauvais fonctionnement des organes. Mieux comprendre les facteurs influençant ce mauvais fonctionnement des organes pourrait modifier le pronostic des patients. Deux types de traitements sont couramment utilisés. Le premier est le remplissage vasculaire (RV). Il consiste à injecter des liquides au malade par voie veineuse pour traiter les atteintes des gros et petits vaisseaux. C'était l'objet de travaux précédents qui portaient sur l'évaluation de l'efficacité de différents liquides de RV pour traiter les états de choc infectieux chez le porcelet anesthésié et ventilé mécaniquement. L'autre principal traitement des chocs infectieux est la prescription d'agents anti-infectieux (antibiotiques et anti-fongiques). L'efficacité de ces anti-infectieux dépend de leur concentration et de leur répartition dans l'organisme. Cette concentration est connue chez le patient sain mais diffère beaucoup chez le patient en choc infectieux en raison des atteintes observées sur les vaisseaux et du RV.

L'objectif de notre projet consiste à étudier le comportement des anti-infectieux dans un modèle de choc infectieux pour mieux comprendre leur répartition lors de l'atteinte des vaisseaux et pouvoir adapter les doses et les temps d'injection. Il s'agit de comparer le dosage des anti-infectieux dans des situations de porosité différentes des vaisseaux lors de l'infection. Nous étudierons la concentration dans le sang des antibiotiques chez le porcelet anesthésié et ventilé non infecté, puis au cours d'un choc infectieux. Une étude microscopique de l'atteinte des vaisseaux sera également réalisée *in vivo* pour comparer les deux groupes. La technique de microscopie confocale avait déjà été utilisée dans nos projets précédents.

L'étude de la pharmacocinétique (devenir du médicament dans l'organisme) des anti-infectieux se fait par modélisation mathématique qui nécessite 8 données pour chaque temps de prélèvement. Afin d'anticiper des pertes dues à l'état de choc mais qu'il est difficile d'anticiper, il a été décidé de relever ce nombre à 10. Ainsi pour chaque anti-infectieux, nous utiliserons un groupe de 10 porcelets et chaque animal sera son propre témoin. En considérant l'étude de 2 anti-infectieux par an, nous envisageons d'utiliser 100 animaux sur 5 ans.

L'ensemble des analyses statistiques sera effectuée par une équipe de médecins statisticiens agréés qui a validé ce modèle de cinétique dans des publications internationales.

La règle des 3R sera respectée :

(Remplacer) Il s'agit d'une étude descriptive qui a pour objectif de démontrer une théorie pharmacocinétique. Il n'existe pas de méthode alternative permettant d'atteindre cet objectif dans des conditions le plus proches possibles des cas cliniques.

(Réduire) Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum en se basant sur les résultats obtenus par des analyses statistiques permettant de calculer le nombre d'animaux nécessaires le plus faible possible. Un même animal va permettre de tester la cinétique des anti-infectieux, d'étudier la porosité des petits-vaisseaux par microscopie confocale et de former des médecins à des gestes qu'ils doivent maîtriser sur l'Homme pour le soigner au mieux. Les animaux de ce projet permettent en parallèle de former les médecins réanimateurs à la réalisation de gestes sous échographie et à la prise en charge du choc infectieux indispensable à leur pratique professionnelle et requise pour la validation de leur formation.

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

L'ensemble de la procédure expérimentale sera réalisée par des médecins anesthésistes formés à l'évaluation de la profondeur de l'endormissement et de la douleur. Ils ont aussi suivi et validé une formation spéciale à l'expérimentation animale permettant la conception et réalisation de procédures expérimentales.

3156. La thérapie cellulaire et génique dans le traitement de cardiomyopathies d'étiologies diverses montre des résultats encourageants chez l'animal. Une des méthodes d'administration privilégiée est la voie d'injection intramyocardique. Cependant, chez les petits animaux, la méthode habituelle d'injection est l'abord direct par thoracotomie gauche. Cette technique a plusieurs inconvénients de par son caractère invasif : le rat doit être intubé et ventilé, il existe un risque de fibrose médiastinale et d'infection. Une mortalité de 10-15 % est rapportée habituellement. Enfin, le site d'injection n'est pas ciblé ni contrôlé (avec un risque d'injection endocavitaire).

Plusieurs équipes ont développé une technique d'injection intramyocardique chez le rongeur sous contrôle échocardiographique avec de bons résultats : sécurité (pas de mortalité rapportée liée au geste) et précision (injection ciblée et réalisée sous échographie). Les avantages de cette technique par rapport à la thoracotomie gauche sont le caractère peu invasif (douleur moindre, anesthésie courte, moins de morbi-mortalité), la possibilité de répéter les injections, l'évaluation

combinée de la fonction cardiaque globale et régionale. Enfin, cette technique est plus proche de la méthode envisagée chez l'homme dans la perspective d'une application clinique.

En effet, la mise en place de cette technique permettra de développer de manière plus adaptée des projets d'évaluation in vivo de produits de thérapie cellulaire (différents types cellulaires, différents prétraitements des cellules) dans la perspective de leur utilisation potentielle chez l'homme. En particulier, notre projet testera après validation initiale, la faisabilité de l'injection dans un modèle de rat immunotolérant permettant d'étudier l'intégration de cellules souches humaines dans le muscle cardiaque du rat.

Le nombre total de rat nécessaire pour l'étude est de 20. Les rats de souche Sprague-Dawley seront utilisés.

Nous prévoyons d'utiliser en partie pour ce projet des rats Sprague-Dawley de notre animalerie et non utilisés. Par exemple, 2 colonies de rats transgéniques et de fond génétique Sprague-Dawley sont en cours de constitution ; certains des rats nés de croisement au sein des colonies ne portent pas le génotype d'intérêt et sont euthanasiés. Nous privilégierons l'utilisation de ces animaux qui n'ont par ailleurs pas d'anomalie cardiaque qui pourrait être un obstacle pour notre projet.

Il n'est pas possible de remplacer ce modèle in vivo par une approche in vitro pour mettre en place cette technique expérimentale qui est en lien direct avec une application thérapeutique in vivo et qui doit être validée dans un modèle cardiaque vivant intégré. L'utilisation de rats est justifiée par la nécessité de valider une nouvelle technique expérimentale chez ce modèle animal, utilisé comme modèle cardiaque pour le développement de la thérapie cellulaire.

Enfin, la validation de cette technique sera une avancée pour ce modèle expérimental car son caractère moins invasif sera plus adapté sur le plan de l'analgésie pour l'animal qu'une thoracotomie gauche.

3157. Le projet a pour objectif de valider la résistance mécanique d'un nouveau dispositif médical implanté dans l'espace extra-péritonéal et de valider son intégration à court terme et moyen terme chez le porc.

Le dispositif a déjà fait l'objet d'une validation in vitro (biocompatibilité des matériaux, propriétés mécaniques sur banc d'essais ...), in vivo (chez le rat et le primate) et d'une étude préliminaire de résistance mécanique chez le porc qui a permis de valider le protocole chirurgical mais qui a également montré la nécessité d'ajouter un renforcement interne au dispositif. Il est nécessaire aujourd'hui, pour permettre l'entrée en phase clinique, d'évaluer l'intégration, et la résistance à court et moyen terme du dispositif suite à l'ajout du système de renforcement. En parallèle de cette analyse à court et moyen terme de l'intégration du dispositif, une analyse histologique à court et moyen terme de la réaction tissulaire ainsi que l'analyse de l'altération potentielle des tissus est indispensable compte tenu de la taille du dispositif, de sa composition et de son site d'implantation. La mise en place d'un suivi par coelioscopie radiologie permettra également de valider cette approche pour l'étude clinique.

Le choix de l'espèce animale est donc justifié par la similitude du site d'implantation par rapport à l'Homme et la taille du dispositif qui ne pourrait être implanté sur un autre animal que le porc. Ce protocole prévoit donc 2 implantations successives (à une semaine d'intervalle) de 2 animaux par temps. L'étude n'excèdera pas deux mois avec des contrôles radiologiques et par coelioscopie de l'intégrité du dispositif et de la réaction tissulaire. Les études déjà réalisées en amont sur les différents modèles animaux ainsi que sur le porc, ont permis de sécuriser l'approche expérimentale afin d'éviter toute souffrance animale en post opératoire.

Ce projet remplit les conditions des 3R :

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

-Réduction : Il ne s'agit pas ici de réaliser des études statistiques mais de valider l'efficacité du renforcement interne intégré au dispositif. L'utilisation de 2 animaux par temps et par épaisseur de renforcement interne semble donc suffisante dans un premier temps.

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

3158. Le cancer du pancréas est aujourd'hui le 9ème cancer en termes d'incidence dans l'union européenne et la 4ème cause de mortalité par cancer. C'est un cancer de la personne âgée (en moyenne 65 ans) avec une survie à 5 ans de 5% des malades. Avec le vieillissement global de la population européenne il est en passe de devenir la 3ème cause de mortalité par cancer dans l'union européenne. Ce projet scientifique a pour but de tester l'efficacité des candidats médicaments développés par une société de biotechnologie visant ce type de cancer. Pour cela des résultats in vitro ont été obtenus lors du développement des principes actifs et nous souhaitons tester les molécules ayant démontré la meilleure efficacité in vitro (test sur des lignées cellulaires humaines de cancer du pancréas) sur des modèles murins de cancer du pancréas (greffes sous cutanées de cellules et greffe directement dans le pancréas des mêmes lignées cellulaires). Afin de valider l'efficacité de ces candidats médicaments nous utiliserons 368 souris (248 sur le modèle de greffe sous cutanées et 120 sur le modèle de greffe dans le pancréas). L'objectif étant de valider l'efficacité de la molécule candidate et de reproduire les résultats positifs qui seraient obtenus.

Les avantages attendus sont la validation de l'efficacité de ce candidat médicament afin de pouvoir avancer dans son développement parvenir à proposer une nouvelle alternative thérapeutique pour ce type de cancer.

Les dommages attendus sur les animaux vont être le développement de tumeurs (liés aux greffes de cellules cancéreuses) ainsi que l'inconfort provoqué par les traitements (injection intra veineuse). Les tumeurs seront sous cutanées pour le modèle de greffe sous cutanées et au niveau du pancréas pour le modèle de greffe dans le pancréas.

Lors de se projet nous appliquons les 3R de la façon suivante:

Remplacer: un premier screening in vitro a été réalisé sur plusieurs lignées cellulaires humaines de cancer du pancréas

Réduire: seule la molécule ayant montré une efficacité in vitro sur 3 lignées cellulaires différentes sera testé in vivo

Raffiner: grâce à l'enrichissement du milieu mis en place au sein de notre établissement et en choisissant des points limites suffisamment précoce. Ces points limites nous permettront d'obtenir des résultats scientifiquement valide tout en réduisant aux maximum la durée de l'expérimentation et ainsi le développement des tumeurs.

3159. De nombreuses tumeurs épithéliales d'origine digestive (colon, pancréas) et gynécologique (ovaire, endomètre et sein) présentent une dissémination péritonéale. A ce stade d'évolution, les recours thérapeutiques sont réduits et le pronostic devient très sombre.

Des études in vitro sur cultures d'adénocarcinomes d'origine humaine ont montré que les anesthésiques locaux (procaine, lidocaïne, bupivacaïne, etc...) étaient capables de réduire de manière dose dépendante la croissance tumorale

Ce travail testera in vivo l'effet des anesthésiques locaux sur la croissance tumorale intra-péritonéale (carcinose péritonéale) chez les rongeurs. L'action anti-tumorale a déjà été étudiée sur divers types de lignées cellulaires. Un certain nombre de ces lignées de cancers épithéliaux (sein, ovaire) se sont avérées sensibles à leur action

Une des limites de l'usage des anesthésiques locaux est la brièveté de leurs durée d'action in vivo à l'inverse des études in vitro dans lesquelles le produit reste en contact permanent avec les cellules. Il s'agit en effet de produits hydrosolubles, rapidement actifs mais rapidement éliminés. Les liposomes, vésicules de nature lipidique, présentent une clearance beaucoup plus longue avec libération progressive de leur contenu thérapeutique

Notre projet est d'utiliser des liposomes chargés de bupivacaïne dans le traitement de carcinose de cancers mammaires humains chez la souris immunodéprimée et de cancers ovariens murins chez la rate. Mais dans un premier temps, il conviendra de démontrer l'innocuité des liposomes après injection intra-péritonéale. Ce protocole comportera 4 groupes comparant l'effet d'un placebo inerte (sérum physiologique), d'un placebo liposome vide susceptible de produire une réaction allergique, de bupivacaïne « nue » afin d'éliminer une réaction allergique propre à la drogue et enfin de liposomes chargés en bupivacaïne qui feront l'objet de cette étude. Une toxicité sera recherchée par des marqueurs sériques d'inflammation précoces (interleukines) et tardifs (protéine C réactive) et par des études histologiques sur prélèvements péritonéaux après euthanasie

Une fois démontrée son innocuité l'efficacité d'un traitement de carcinose péritonéale de cancer du sein sera étudiée après administration intra-péritonéale de lignées cellulaires humaines de cancers du sein chez la souris immunodéficente femelle et de lignées de cancer de l'ovaire de ratte chez la ratte. Les liposomes de bupivacaïne seront :

- injectés le même jour que les cellules tumorales reproduisant le geste thérapeutique réalisé lors d'une intervention d'exérèse
- injectés à distance de l'ensemencement pour reproduire un traitement différé avec carcinose déjà constituée

Dans chaque protocole expérimental l'efficacité de ces deux méthodes sera comparée avec un groupe témoin recevant un placebo liposome et un groupe traité recevant les liposomes de bupivacaïne. Le suivi de la survie sera réalisé avec des groupes de 10 animaux : les points limites expérimentaux seront l'apparition d'une ascite à l'examen clinique pluri-hebdomadaire chez la souris Nude (l'ascite hémorragique est visible à travers la paroi abdominale translucide) et toutes les semaines à partir du 3ème mois en raison d'une évolution beaucoup plus lente chez la ratte Fisher. Le diagnostic précoce d'une ascite hémorragique est difficile du fait de sa pilosité. Une anémie avec un taux d'hémoglobine inférieur à 9 g/100 ml sera donc recherchée. Ainsi toute souffrance animale sera évitée. Une différence statistique entre les survies sera recherchée par test du Log Rank

L'efficacité sera également appréciée par l'index de carcinose péritonéale (ICP), après sacrifice (n=6 dans chaque groupe) bien avant la date correspondant à la médiane de survie déterminée dans l'étude précédente. La diffusion de la carcinose sera quantifiée après sacrifice de l'animal (score de Sugar Baker modifié pour l'animal\*) et le volume global des tumeurs péritonéales mesuré. La comparaison de la progression tumorale entre groupes reposera donc sur les 3 paramètres qui sont : survie, ICP, volume de la carcinose. Une étude statistique sera réalisée sur ces différents paramètres afin de mettre en évidence l'action thérapeutique

Le premier PE sur la toxicité sera réalisé sur 32 animaux, les 2 PE suivants sur 64 animaux chacun (32 pour l'effet précoce et 32 pour le retardé) soit un total de 160

Cette demande respecte la règle des 3R:

- le remplacement, l'étude in vitro a déjà été réalisée démontrant l'efficacité des anesthésiques locaux sur les cancers du sein et de l'ovaire. Le passage à l'expérimentation se justifie par le fait que d'une part l'élimination de l'anesthésique local est très rapide chez le vivant (à l'inverse de la culture où elle reste présente jusqu'à complète consommation ou changement du milieu de culture) et que la composante immunitaire, très importante dans les traitements anti-cancéreux, est absente in vitro (l'usage de co-cultures avec cellules immunologiquement compétentes demande de connaître le/les types cellulaires impliqués dans la réponse)

- la réduction, le nombre d'animaux retenus (10 par groupe pour les études de survie et 6 par groupe pour les index de carcinose péritonéale) correspond au minimum statistique apte à dégager une signification statistique non ambiguë en raison

de la puissance des tests utilisés. Un effet de la bipuvacaine liposomiale, sera indubitable ; de même en ce qui concerne son absence d'effet

- le raffinement, les animaux seront sacrifiés avant l'apparition de signes cliniques de douleurs tels que prostration, poil hérissé, amaigrissement, en ce qui concerne l'étude de survie, le signe retenu étant le début d'une ascite hémorragique ou un degré d'anémie compatible avec le bien-être de l'animal. Pour l'index de carcinose péritonéale, le sacrifice aura lieu avant l'intervalle - 95% de la médiane de survie établie lors de l'étude de survie. Ainsi toute souffrance sera évitée

3160. Le but de ce projet est d'évaluer la pathogénicité d'agents infectieux (bactéries, virus ou parasites) et la protection induite par des candidats vaccins ou des anticorps chez le primate non humain.

Comme préconisé par les autorités de santé, l'évaluation de la protection induite par de nouveaux candidats vaccins ou des anticorps doit être effectuée in vivo dans des modèles animaux naïfs ou pré-infectés, en particulier lorsque les corrélats de protection ne sont pas complètement identifiés. Le recours aux modèles primates non-humains peut s'avérer nécessaire par rapport aux modèles de petits animaux de type rongeur lorsque le pathogène et le candidat vaccin ou anticorps testés présentent une spécificité d'espèce proche de l'homme.

Les espèces utilisées pour ce projet sont des singes cynomolgus (*Macaca fascicularis*) et singes rhésus (*Macaca mulatta*). Le modèle animal utilisé est sélectionné en fonction de la maladie infectieuse ciblée, du type de réponse immune analysée et des données de la littérature ou des connaissances scientifiques.

La réponse immune induite post-infection est également évaluée.

Si des animaux présentent une dégradation de l'état général, des lésions ou des symptômes nécessitant l'euthanasie, celle-ci sera effectuée selon les méthodes réglementaires recommandées. Le degré de sévérité est considéré comme modéré.

L'ensemble de ce projet peut nécessiter l'utilisation de 350 primates non-humains sur une période de 5 ans (basée sur une évaluation des besoins actuels).

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives in vitro pour évaluer les capacités d'un candidat vaccin ou d'un anticorps à induire une protection contre une infection à un pathogène ou pour évaluer les réponses immunitaires post-infection. Le recours à l'animal de laboratoire s'avère donc nécessaire.

Réduction :

Chaque étude est revue par les biostatisticiens afin de définir le nombre minimum et suffisant d'animaux requis permettant une analyse statistique des résultats.

Raffinement :

Les animaux sont hébergés en groupe dans des grandes cages (volières) contenant des dispositifs d'enrichissement dans des locaux appropriés, conformes aux standards réglementaires. Ils sont suivis par un personnel spécifiquement formé à ces espèces.

En fonction des pathogènes, une grille d'évaluation des signes cliniques post-infection spécifique de chaque pathogène pourra être mise en place entre le responsable d'étude, les biostatisticiens et les vétérinaires cliniciens afin de raffiner les modèles expérimentaux.

En cas de signes cliniques, et dans les meilleurs délais, les animaux bénéficieront des soins vétérinaires nécessaires, ou seront euthanasiés selon les méthodes recommandées.

3161. La sclérose en plaques est une maladie inflammatoire chronique affectant le système nerveux central et débutant dans la grande majorité des cas chez l'adulte jeune. Ses causes restent encore mal connues. Les troubles neurologiques qui l'accompagnent touchent diverses fonctions comme la motricité, la sensibilité ou la vision. Ils sont la conséquence d'une perte des gaines de myéline entourant les fibres nerveuses du cerveau et de la moelle épinière. Les épisodes de démyélinisation peuvent régresser sur le plan clinique, ce qui reflète une réparation des gaines de myéline. Mais pour des raisons méconnues, cette capacité de réparation peut-être très variable. Les traitements actuellement disponibles en clinique permettent de réduire l'apparition des épisodes de destruction de la myéline, mais ceux capables de régénérer la myéline ne font pas encore partie de l'arsenal thérapeutique classique. Il est important de connaître les raisons du défaut de réparation de la myéline et d'identifier des protéines qui pourraient être la cible de nouveaux médicaments pour favoriser cette réparation.

Notre projet vise à déterminer si des protéines appartenant à deux voies de signalisation qui sont importantes pour le processus de réparation de la myéline, la voie Hedgehog et la voie des androgènes, pourraient être considérées comme de nouvelles cibles thérapeutiques dans la sclérose en plaques. Dans ce but, nous allons utiliser un modèle de démyélinisation chez la souris afin de mimer le processus de dégénérescence de la myéline observé chez l'Homme. Des cultures de cellules ne peuvent remplacer les animaux que nous allons utiliser, car elles ne peuvent reproduire les mécanismes complexes qui se produisent au cours des processus de lésion, puis de réparation du tissu cérébral. Le modèle de démyélinisation que nous allons utiliser est classique dans ce domaine de la recherche. Il est basé sur l'administration d'une molécule incorporée à la nourriture des souris pendant 6 semaines. Ce modèle a l'avantage de permettre une démyélinisation de la matière blanche et de la matière grise du cerveau comme on peut l'observer dans la maladie humaine. La démyélinisation est réversible puisqu'à l'arrêt du traitement, la myéline est régénérée. Les animaux traités ne présentent aucun déficit neurologique majeur, parce que les axones des neurones ne sont pas endommagés. Cependant, tout au long du traitement, les animaux feront malgré tout l'objet d'une étroite surveillance. De plus, ils seront placés dans un environnement enrichi (4 souris par cage et présence d'objets dans la cage). Nous utiliserons des lignées de souris qui permettent de moduler l'activité des voies de signalisation

qui nous intéressent dans chacun des types cellulaires qui interviennent dans le processus de régénération: les oligodendrocytes qui synthétisent la myéline, les cellules astrocytaires et microgliales qui sont activées dans le tissu démyélinisé et sont capables soit de promouvoir, soit d'empêcher la réparation de la myéline. Nous réduisons au maximum le nombre d'animaux nécessaires en calculant que deux fois 8 animaux pour chaque lignée sont suffisants pour mettre en évidence une différence dans la capacité des animaux à régénérer la myéline perdue et à répondre à la démyélinisation par l'activation des astrocytes et de la microglie. Nous incluons donc 288 souris au cours des 4 années du projet.

3162. Dans le processus de développement d'un candidat médicament humain (et éventuellement vétérinaire, lorsque le produit est susceptible d'être retrouvé dans l'alimentation humaine), les études de Pharmacologie de Sécurité ont pour objectif d'examiner de potentiels effets pharmacodynamiques d'une substance sur les fonctions physiologiques en relation avec une exposition à des doses thérapeutiques ou inférieures. Ces études sont réalisées avant les études cliniques afin de s'assurer que l'administration chez l'homme n'aura aucun impact majeur sur les fonctions vitales.

Ainsi, on distingue plusieurs types d'investigations de Pharmacologie de Sécurité :

- les études principales ou fondamentales qui vont évaluer de potentiels effets d'une substance sur les fonctions vitales (fonction cardiovasculaire, fonction respiratoire et système nerveux central).
- les études de suivi (follow-up) qui ont pour objectif d'approfondir la compréhension des effets observés lors des études fondamentales sur les fonctions vitales,
- les études supplémentaires qui ont pour but d'évaluer les potentiels effets d'une substance sur des organes ou fonctions non couverts par les études fondamentales (fonction rénale, fonction gastro-intestinale...)
- les études d'efficacité qui vont évaluer l'efficacité d'une substance sur un modèle pathologique expérimental (glycémie, diurèse, ototoxicité...)

Le choix de l'espèce pour les études de pharmacologie de sécurité est basé sur plusieurs critères notamment la réponse pharmacodynamique du modèle animal, le profil pharmacocinétique, la susceptibilité et/ou la sensibilité du modèle pour la fonction physiologique évaluée et les données préalablement obtenues chez l'espèce considérée (obtenues notamment lors d'études préalables de Toxicologie). Le présent projet a pour objectif de décrire les différentes études de Pharmacologie de Sécurité chez les rongeurs et le lapin.

Les voies d'administration peuvent être diverses et dépendent de la voie d'administration envisagée chez l'homme : orale (gavage), intra-musculaire, sous-cutanée, intrapéritonéale ou intraveineuse.

Du fait de leurs objectifs liés aux différentes fonctions vitales d'un organisme et aux aspects de pharmacodynamique, il n'existe pas de méthodes in vitro alternative pour la réalisation des procédures décrites dans le présent projet. L'organisme dans son entier doit être pris en compte dans les évaluations de Pharmacologie de Sécurité.

Le nombre total d'animaux utilisés par espèce dans le cadre de ce projet peut être évalué comme suit :

- . Souris : environ 2400 individus pour 5 ans
- . Rats : environ 4460 individus pour 5 ans
- . Hamster : environ 50 individus pour 5 ans
- . Cobaye : environ 660 individus pour 5 ans
- . Lapin : environ 50 individus pour 5 ans

Les dommages escomptés sont limités du fait du principe même des études de pharmacologie de sécurité pour lesquelles les doses administrées aux animaux sont choisies sur la base d'étude de toxicologie afin que les doses administrées ne provoquent pas d'effets toxicologiques pouvant masquer les effets pharmacologiques recherchés sur les fonctions vitales.

Le projet est mis en œuvre dans un cadre réglementaire et permet l'évaluation de potentiels effets pharmacodynamiques d'une substance sur les fonctions physiologiques en relation avec une exposition à des doses thérapeutiques ou inférieure. La réalisation de ce projet permet de réaliser les études précliniques de Pharmacologie de Sécurité chez le rongeur ou le lapin qui sont une étape préliminaires aux investigations cliniques chez l'homme.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, un design en cross-over est utilisé aussi souvent que possible. Ceci consiste à traiter tous les animaux à toutes les doses dans un ordre aléatoire avec une période de récupération entre chaque administration de la substance. Ce design permet de n'avoir qu'un seul groupe d'animaux plutôt qu'un groupe par dose à tester. Il n'est possible que si la toxico-cinétique de la substance à tester est connue.

Le nombre d'animaux est déterminé a minima afin d'obtenir des résultats statistiques robustes et d'atteindre les objectifs des études.

L'état de santé des animaux est vérifié à intervalle régulier tout au long des études et via un monitoring en continu pour certains types d'études impliquant l'enregistrement de données physiologiques (signaux respiratoires, cardiaques, nerveux).

D'autre part, le principe même des études de pharmacologie de sécurité implique l'utilisation de doses thérapeutiques aux effets toxicologiques très limités voire absents.

Enfin, dans la mesure du possible (dose thérapeutique connue, données préliminaires suffisantes...), les évaluations de pharmacologie de sécurité sur le rongeur ou le lapin sont intégrées dans les études de toxicologie afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Ceci permet d'une part de faire les investigations de Pharmacologie de Sécurité chez les mêmes animaux que ceux impliqués dans les études de toxicologie et d'autre part d'avoir des informations précoces sur l'impact d'un candidat médicament sur les fonctions vitales.

3163. Les maladies hémorragiques constitutionnelles, telles que l'hémophilie ou la maladie de Willebrand affectent un pourcentage non négligeable de la population (1-2 naissances mâles/10 000 pour l'hémophilie et environ 0.1% de la

population pour la maladie de Willebrand). Sous leur forme sévère, ces pathologies peuvent entraîner des saignements non contrôlés qui peuvent conduire à la mort. Les traitements disponibles actuellement sont extrêmement coûteux ce qui fait que 70% des hémophiles dans le monde n'y ont pas accès. Ces traitements consistent principalement en une thérapie de substitution visant à remplacer le facteur de la coagulation qui fait défaut (soit en étant absent, soit en n'étant pas fonctionnel). Ils consistent en l'injection de ces facteurs pro-coagulants par voie intraveineuse 2 à 3 fois par semaine, impactant de façon importante la qualité de vie des patients affectés. De plus, une complication importante associée à ces traitements est l'apparition d'anticorps inhibiteurs qui vont neutraliser la molécule injectée et la rendant donc inefficace. Le traitement des patients qui développent de tels inhibiteurs se complique alors très fortement.

Nous développons des alternatives aux traitements existants en ciblant trois objectifs complémentaires : 1) le développement de facteurs pro-coagulants à demi-vie prolongée afin que les traitements administrés aux patients soient moins fréquents (1/semaine ou 1 toutes les deux semaines) ; 2) le développement de traitements basés sur l'utilisation de petites molécules ou d'anticorps pro-coagulants qui pourraient dans le futur être administrés par une voie sous-cutanée ou orale plutôt qu'intraveineuse ; 3) le développement de nouvelles molécules procoagulantes pour le traitement des patients hémophiles ayant développé des inhibiteurs ou pour les patients atteints de sous-types particuliers de maladie de Willebrand.

Le système de la coagulation est complexe, faisant intervenir de nombreux acteurs, autant des molécules procoagulantes que leurs inhibiteurs mais aussi des phospholipides membranaires. Actuellement les tests disponibles in vitro, même s'ils se sont beaucoup améliorés depuis quelques années, ne permettent pas de reproduire l'intégralité de ce processus. Par conséquent, afin de tester l'efficacité anti-hémorragique de nouvelles molécules procoagulantes, il est crucial de pouvoir tester leur effet dans des modèles animaux reproduisant des pathologies hémorragiques.

Nous prévoyons d'utiliser 2880 souris pour ce protocole. Ce nombre est justifié par le nombre important de molécules anti-hémorragiques à tester dans trois modèles murins de pathologie hémorragique et avec deux modèles de saignement différents. Pour chaque dose de chaque molécule, 10 souris seront utilisées afin que malgré les variations des tests de saignement, il soit possible d'obtenir des résultats significatifs d'un point de vue statistique.

Les procédures sont effectuées sous anesthésie générale et des points limite ont été fixés pour arrêter l'expérimentation dans le cas de souffrance ou de détérioration de l'état des animaux. Les souris seront placées en cage avec 3-4 animaux/cage dans des portoirs ventilés. Aucune souris isolée n'est admise dans nos protocoles. Pour le bien être des animaux, une litière mélangée est utilisée et le milieu est enrichi par l'ajout de « sizzle nest » autoclavé et de petits blocs en bois à ronger. Les souris recevront nourriture et boisson ad libitum.

3164. Certains polymorphismes génétiques des récepteurs à la nicotine sont associés à l'incidence des cancers pulmonaires. La signification physiopathologique de cette découverte reste encore inconnue et le rôle de ces polymorphismes reste à étudier. Les objectifs de notre projet sont donc de rechercher, en utilisant en particulier des modèles murins, l'implication des récepteurs à la nicotine exprimés au niveau pulmonaire, et en particulier de leurs polymorphismes génétiques, dans les événements conduisant au cancer pulmonaire. Le but de notre étude est ici de focaliser sur un polymorphisme d'un des récepteurs à la nicotine, qui se traduit par une mutation D398N, polymorphisme fortement associé à l'incidence des cancers broncho-pulmonaires.

Lors de précédents travaux, nous avons montré des altérations de la réparation de l'épithélium des voies aériennes de souris exprimant la mutation D398N, la réparation est ainsi plus lente et est accompagnée d'une inflammation plus marquée. Nous pensons que les altérations de la régénération épithéliale induite par la mutation D398N pourraient favoriser l'émergence de pathologies pulmonaires. Nous avons depuis peu à notre disposition une lignée de souris exprimant la mutation D398N. Nous envisageons ici de vérifier 1) si les souris D398N développent spontanément des lésions pulmonaires, 2) si les souris D398N sont plus sensibles à développer des tumeurs pulmonaires dans un modèle de carcinogenèse induite chimiquement et 3) si la répétition de lésions de l'épithélium respiratoire chez les souris D398N favorise l'émergence de pathologies pulmonaires.

Notre projet, visant à étudier les remaniements tissulaires associés à la mutation D398N, est conditionné par l'utilisation de souris transgéniques exprimant cette mutation et récemment mises à notre disposition dans la cadre d'une collaboration. Ce projet ne peut être réalisé sur des cultures de cellules pulmonaires, par ailleurs maîtrisées au laboratoire. En particulier, l'étude de la réparation tissulaire et de la carcinogenèse ne peut être réalisée qu'in vivo.

Nous avons essayé de restreindre au minimum le nombre d'animaux utilisés. La plupart des protocoles expérimentaux, en particulier le protocole de lésion pulmonaire, sont maîtrisés par le laboratoire depuis plusieurs années. Nous en connaissons donc la variabilité expérimentale et le nombre d'animaux à inclure dans chaque protocole est réduit au minimum. Les tests d'analyse statistique non paramétriques, adaptés aux échantillons faibles, sont systématiquement utilisés. Ce projet sur 5 ans nécessite l'utilisation de 520 souris : 260 souris Kia5 et 260 souris témoins C57BL/6.

Certains protocoles impliquent des lésions pulmonaires ou l'induction de tumeurs. Les protocoles ont été systématiquement discutés avec un vétérinaire ; des anesthésiques et/ou analgésiques sont utilisés lorsque jugés nécessaires et les animaux sont surveillés au moins une fois par jour pour observer tout comportement anormal témoin d'une souffrance. Les protocoles sont parfois très longs, de quelques semaines à un an, et une attention particulière est portée à l'enrichissement du milieu : sélection de litières propices à l'aménagement, utilisation en simultané ou en alternance de solutions d'enrichissement : tubes, dômes, plaquettes de fibres de diverses composition, frisettes en carton. Les animaux reçoivent de la nourriture et de l'eau à volonté.

3165. Le micro-environnement inflammatoire est la conséquence et le moteur de la tumorigenèse. Les patients atteints de maladie inflammatoire chronique des intestins développent plus de cancers coliques que la population générale. En effet,

cellules épithéliales et cellules immunitaires sont liées par des interactions complexes et encore aujourd'hui les facteurs régulant ces interactions sont peu connus. Parmi ces facteurs, l'ATP extra-cellulaire (ATPe) est un candidat prometteur qui, lorsqu'il se lie aux récepteurs purinergiques, contrôle aussi bien la mort cellulaire que la prolifération des cellules.

Des données récentes ont démontré le rôle crucial d'un complexe protéique comprenant la protéine P2RX7 dans l'émergence d'une réponse immunitaire anti tumorale qui prévient la rechute tumorale.

Dans ce contexte, nous avons montré que le récepteur P2RX7 est exprimé différemment au niveau des muqueuses de patients présentant des maladie inflammatoire chronique des intestins en phase active ou stable et que la protéine P2RX7 contrôle une boucle d'amplification de la réponse inflammatoire. De plus, l'absence de ce récepteur sur un modèle de souris, diminue l'inflammation des muqueuses coliques alors qu'elle augmente le risque de formation de tumeurs au niveau du colon.

Ces observations qui soulignent le rôle suppresseur de tumeur du récepteur P2RX7, justifient des investigations supplémentaires afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables de cet effet anti-tumoral. De plus, ces résultats suggèrent que le renforcement de la fonction de P2RX7 pourrait avoir un effet thérapeutique anti-tumoral important. Ainsi, ce projet vise à caractériser quels sont les compartiments cellulaires qui transmettent l'effet suppresseur de tumeur de P2RX7. Nous utiliserons différentes lignées transgéniques, où la suppression de notre gène d'intérêt s'effectue grâce à la Cre recombinase. Cette Cre recombinase s'exprime dans des compartiments spécifiques comme l'épithélium intestinal, les cellules myéloïdes ou lymphoïdes. De plus, l'expression de cette Cre peut être contrôlée dans le temps car elle est inductible. Cette stratégie représente ainsi un design expérimental unique permettant de déterminer la contribution relative de P2RX7 dans la réponse inflammatoire et tumorale.

Un deuxième aspect du projet sera de tester des molécules agonistes et antagonistes de P2RX7 (molécules mises au point et fournies par nos collaborateurs chimistes) pour évaluer leur capacité à réduire la réponse inflammatoire associée à l'activation de P2RX7 mais aussi à "booster" l'effet suppresseur de tumeur de P2RX7.

Dans ce projet les animaux seront soumis à des procédures expérimentales visant à induire des colites aiguës et des cancers du côlon. Ces procédures peuvent engendrer une douleur. Pour le bien-être des animaux, nous avons établi une grille de score visant à définir des seuils à partir desquels un traitement analgésique sera administré et un point limite à partir duquel l'expérience sera arrêtée. Au-delà de ces mesures de raffinement, nous portons aussi une attention particulière au remplacement et à la réduction.

- Le nombre d'animaux utilisé lors des expériences sera établi de façon à obtenir des résultats statistiquement significatifs;
- Une étude exhaustive de la littérature a été menée avant d'initier ce projet pour s'assurer de la non reproduction de résultats déjà publiés;
- Aucune méthode de remplacement n'est actuellement disponible.

Le nombre total d'animaux prévus dans ce projet est de: 780

3166. L'hémostase est un processus central à tout organisme vivant car il regroupe l'ensemble des mécanismes physiologiques qui contribuent à l'arrêt et à la prévention des saignements. L'hémostase fait intervenir de nombreux facteurs et doit être soumise à une régulation très précise car une quantité trop faible des facteurs impliqués conduit à un phénotype hémorragique tandis qu'une quantité augmentée conduit à un risque de thrombose, le versant pathologique du processus hémostatique. Il est donc crucial que la concentration plasmatique de ces différents facteurs soient finement contrôlée. Cette concentration plasmatique est le résultat d'un équilibre entre biosynthèse et élimination ou clairance en ce qui concerne les molécules natives et uniquement le versant clairance pour ce qui concerne les molécules thérapeutiques qui sont injectées aux patients.

En ce qui concerne les molécules natives, les voies de synthèse de ces différents facteurs sont en général assez bien élucidées tandis que les mécanismes de clairance sont quant à eux beaucoup moins bien connus. En ce qui concerne les molécules thérapeutiques, la pharmacocinétique est très importante puisqu'elle déterminera la fréquence de traitement des patients.

Toutes les molécules étudiées dans ce projet sont soit déjà administrées à des patients souffrant de pathologies hémorragiques (hémophilie, maladie de Willebrand) soit en développement préclinique. Une des limites actuelles de ces traitements, limite qui impacte fortement la qualité de vie est la fréquence d'administration de ces molécules thérapeutiques (2-3 fois/semaine en injection intra-veineuse). Il y a actuellement une forte demande pour le développement de molécules à demi-vie longue. Pour atteindre cet objectif, il est impératif de connaître les mécanismes par lesquels ces différentes molécules sont éliminées. Ce projet a donc pour but d'étudier ces mécanismes et aussi de tester l'effet de modifications ciblées des protéines en question afin de pouvoir dans le futur proche proposer des molécules qui pourraient n'être administrées qu'une à deux fois/mois.

Ce projet nécessite l'utilisation d'animaux car autant les mécanismes de synthèse d'une protéine peuvent être étudiés grâce à des modèles cellulaires, autant les mécanismes de clairance requièrent l'utilisation d'organismes entiers susceptibles de procéder à l'élimination des glycoprotéines au niveau de différents organes.

Nous prévoyons d'utiliser 2268 souris pour ce protocole. Ce nombre se justifie par le fait que nous allons étudier plusieurs facteurs de la coagulation et aussi par le fait que nous prévoyons de tester l'élimination de ces molécules dans plusieurs souches de souris, certaines invalidées pour l'expression d'un récepteur potentiel de clairance. Toutefois, pour une expérience donnée (1 facteur, 1 souche de souris), seules 21 souris seront utilisées par expérience. D'après notre expérience dans ces expériences de clairance, 3 souris/temps de prélèvement permettent d'obtenir des résultats pouvant conduire à des calculs de paramètres pharmacocinétiques pertinents.

Les analyses statistiques seront réalisés par des tests de Student sur échantillons non paires.

En ce qui concerne le raffinement, il est à noter que l'expérience sera réalisée sur la période la plus courte possible (24 heures) et ne comportera qu'une seule injection intraveineuse et un ou deux prélèvements sanguins sous anesthésie. Tout sera mis en œuvre pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux utilisés. Nous adapterons la procédure en tenant compte des points limites à ne pas dépasser, en particulier une éventuelle perte de poids de l'animal ou un comportement indicateur d'une souffrance quelconque. Les souris sont placées en cage avec 3-4 animaux/cage dans des portoirs ventilés. Aucune souris isolée n'est admise dans nos protocoles. Pour le bien être des animaux, une litière mélangée est utilisée et le milieu est enrichi par l'ajout de « sizzle nest » autoclavé et de petits blocs en bois à ronger. Les souris recevront nourriture et boisson ad libitum.

3167. La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative 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.

Dans des études antérieures, l'équipe a identifié que deux gènes, *Nxn1* et *Nxn2*, codaient pour des facteurs impliqués dans la survie des photorécepteurs à cônes au niveau de la rétine, le RdCVF « Rod-derived Cone Viability Factor » et le RdCVF2. Contrairement au gène *Nxn1*, l'expression du gène *Nxn2* n'est pas restreinte aux photorécepteurs. Ce dernier s'exprime dans d'autres régions du système nerveux central (SNC). Ces deux gènes codent chacun pour une forme courte et une forme longue de la protéine (RdCVF/RdCVFL et RdCVF2/RdCVFL2). Les souris *Nxn2*<sup>-/-</sup>, déficientes en RdCVF2 et RdCVF2L, développent les mêmes symptômes qui reproduisent les symptômes de la MA humaine, avec un déficit mnésique à 2 mois (chez la souris) puis avec l'apparition d'agrégats de protéine Tau entraînant une démence (18 mois chez la souris). L'apparition tardive de ces agrégats ne peuvent être responsables des troubles mnésiques précoces. Nous avons donc émis l'hypothèse que le RdCVF2/RdCVF2L pourrait jouer un rôle protecteur sur le SNC comme pour le RdCVF/RdCVFL sur les photorécepteurs.

Dans ce projet, nous allons tenter de vérifier cette hypothèse en injectant du RdCVF2 ou RdCVF2L à l'aide d'outils viraux à des souris qui en sont déficientes (souris *Nxn2*<sup>-/-</sup>). L'observation d'une prévention de l'apparition des troubles mnésiques corroborera notre hypothèse.

Au total, 45 animaux (souris *Nxn2*<sup>-/-</sup>) seront nécessaires à cette étude.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les conditions d'hébergement seront adaptées au modèle. 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 ».

3168. L'objectif de ce projet est de produire un médicament recombinant à usage humain à partir de lait de lapines.

Les lapines (700 femelles reproductrices par an donc 3500 sur 5 ans, nombre déterminé en fonction du nombre de litres de lait à fournir dans le cadre des études cliniques menées par notre client et à visée commerciale), utilisées pour ce projet, sont porteuses d'un gène leur permettant de produire une protéine thérapeutique dans leur lait. Elles sont traitées régulièrement et la protéine d'intérêt est purifiée.

Comme dans une production laitière classique, les animaux nés permettent d'induire et de maintenir la lactation mais n'ont pas vocation à être maintenus en production. Ainsi, à la fin des 3 semaines de traite, ces lapereaux (168 300 sur 5 ans) sont euthanasiés. Le nombre total d'animaux utilisés sur 5 ans pour ce projet correspond à 3500 femelles adultes pour la traite + 168 300 lapereaux + 2000 animaux pour le renouvellement des cheptels soit 173 800 animaux.

Pour ce développement pharmaceutique, le candidat favori en tant que bioréacteur est le lapin. En effet, il est doté d'une glande mammaire qui possède toute la machinerie cellulaire permettant d'apporter les modifications post-traductionnelles, nécessaires à l'activité biologique des protéines recombinantes humaines.

Depuis la création de cette activité, les méthodes de production ont constamment été améliorées et continuent de l'être afin d'obtenir la plus grande quantité de matière active par animal et donc de limiter le nombre de sujets utilisés. Ces améliorations sont également réalisées pour intégrer toutes les réglementations s'appliquant à l'expérimentation animale (hébergement, formation du personnel, prise en compte de la souffrance animale).

3169. Ce projet de recherche fondamentale a pour but de découvrir des marqueurs comportementaux et biologiques de vulnérabilité au développement de conduites addictives et à la rechute, ainsi que d'identifier des facteurs pronostiquant la réponse thérapeutique aux traitements de substitution. L'identification de marqueurs biologiques périphériques reflétant des modifications cérébrales pourrait ultérieurement être utilisée dans des études cliniques pour aider au diagnostic de la maladie et au pronostic de l'efficacité des traitements de substitution. Ce projet de recherche fondamentale s'intéresse donc à des questions de santé publique. Ce projet ayant pour but d'étudier des phénomènes psychiatriques et des processus pathologiques, les méthodes alternatives actuelles sont insuffisantes et il doit donc être réalisé chez des animaux. Pour cela, nous utiliserons des rats. Le rat est un modèle de référence dans le domaine des addictions. Il possède une organisation anatomique et structurelle du cerveau comparable à celle de l'Homme. De plus, il est idéal pour les études comportementales car il est capable d'apprendre des tâches complexes et peut réaliser des comportements élaborés. Pour réduire au minimum le nombre de rats utilisés, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes et à la biostatistique. Le nombre total nécessaire à la réalisation de ce projet est de 714 rats pour une durée de 5 ans. Ce projet met en jeu des procédures chirurgicales, l'administration de substances à action psychotrope, des prélèvements sanguins et une évaluation des fonctions cognitives et émotionnelles des rats à l'aide d'une batterie de tests comportementaux. Toute douleur, souffrance, angoisse ou stress qui



pourraient être observées seront soulagées à n'importe quelle étape de la procédure. Une grille d'évaluation sera utilisée pour détecter tout signe de douleur chez les animaux. Tout animal chez lequel des critères de douleur seront observés recevra des analgésiques. Des douleurs sévères selon la grille d'évaluation entraîneront l'euthanasie anticipée de l'animal.

3170. La qualité sanitaire des aliments est une préoccupation majeure en France, en Europe et dans le monde. Dans ce cadre, il faut se pencher sur la possible contamination de l'alimentation destinée à l'homme ou à l'animal par des champignons et le risque associé de la présence de mycotoxines. Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par les champignons. Les mycotoxines sont des contaminants relativement communs des céréales et environ 25 % des récoltes mondiales sont contaminées. De plus, la majorité des mycotoxines ne sont pas dégradées par la chaleur et restent présentes même après la disparition des champignons.

Les syndromes toxicologiques cliniques provoqués par l'ingestion de fortes quantités de ces toxines sont bien caractérisés. Ils provoquent des retards de croissance, des troubles de la reproduction jusqu'à la mortalité. Ces toxines peuvent altérer les réponses immunitaires, diminuer la résistance aux maladies infectieuses et de plus elles peuvent générer de grosses pertes économiques pour l'éleveur.

L'étude que nous voulons mener s'inscrit donc dans une problématique de lutte envers ces mycotoxines. La toxine étudiée est connue pour avoir un effet anorexique. Le but est donc de comparer la toxicité de cette mycotoxine à l'un de ses dérivés supposé détoxifié et d'observer leur effet anorexique sur des animaux d'élevage. Pour cela, on compare l'influence de ces molécules sur des hormones impliquées dans l'anorexie.

Une cinétique d'hormones ne pouvant être réalisée sur des modèles cellulaires, l'organisme entier de l'animal est donc nécessaire pour cette étude. Le porc étant le modèle le plus approprié pour ce genre d'expérimentation, 36 porcelets issus d'un élevage de porc destinés à la consommation courante seront consacrés à cette étude. Le nombre d'animaux choisis permet une analyse statistique correcte tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés. Les animaux recevront une seule dose de chaque molécule à tester à des concentrations n'affectant pas leur état sanitaire. Dans un souci de raffinement, de faibles quantités de sang seront prélevées au niveau de l'oreille.

3171. L'insuffisance cardiaque est une maladie chronique évolutive dans laquelle la pompe cardiaque ne peut assurer le débit cardiaque nécessaire au fonctionnement de l'organisme. Elle constitue un enjeu majeur en termes de santé publique et c'est la pathologie cardiovasculaire qui présente le taux de croissance le plus rapide en raison du vieillissement de la population et d'une meilleure prise en charge de l'infarctus du myocarde.

La stimulation du nerf vague, qui permet de moduler l'activité parasympathique pour rééquilibrer la balance sympathico-vagale, fait partie des approches novatrices potentielles pour le traitement de l'insuffisance cardiaque.

Le projet de recherche prolonge une étude en cours, avec toujours pour but d'explorer la stimulation vagale et ses effets sur le système cardio-vasculaire, et de valider des concepts innovants liés aux modalités de stimulation et à la détection des signaux physiologiques.

Étant donné la complexité des processus physiologiques mis en œuvre, des animaux supplémentaires sont nécessaires et vingt moutons sains viennent ici compléter le premier lot d'animaux. Ces essais permettront en particulier de poursuivre l'exploration des mécanismes d'action liés à la stimulation du nerf vague, qui restent méconnus : fibres nerveuses sollicitées, chemins d'activation mis en jeu, variables de contrôle associées au traitement de l'insuffisance cardiaque, etc.

La compréhension de ces mécanismes est essentielle pour une future mise en œuvre clinique car elle permet de justifier scientifiquement les choix technologiques et thérapeutiques, d'optimiser la thérapie à délivrer, de mieux identifier les patients qui pourraient tirer bénéfice de la neurostimulation, ou encore de réduire les effets indésirables associés.

Les essais à réaliser restent nombreux, ils seront répartis sur 3 groupes de 6 animaux afin de rationaliser les expérimentations menées sur chaque animal. Soit 18 animaux, auxquels s'ajoutent 2 animaux en cas de décès ou de comportement singulier, menant à un total de 20 animaux.

Au cours d'une unique journée d'expérimentation, ils seront anesthésiés et implantés du matériel nécessaire, puis sacrifiés. Afin de réduire la souffrance des animaux, l'unique procédure expérimentale de chirurgie se fera après une prémédication et sous anesthésie générale. Les moutons recevront une injection de morphine en début de procédure et toutes les 4 heures. Des points-limites ont été établis.

3172. La dégénérescence valvulaire est responsable d'une sténose aortique chez le sujet âgé. Cette pathologie peut conduire à terme à une insuffisance cardiaque. Jusqu'à présent, le traitement de référence est le remplacement valvulaire par voie chirurgicale : excision de la valve native et mise en place d'une prothèse valvulaire (essentiellement une bioprothèse du fait de l'âge avancé des patients). Pour les patients ayant un risque chirurgical élevé, le traitement peut consister en la mise en place par voie percutanée d'un nouveau type de bioprothèse : les stents valvés. Ce sont des « bioprothèses » constituées de 3 feuillets de péricarde bovin ou porcin, montés sur un stent. Les stents sont des structures tubulaire, maillées et métalliques. Ces prothèses sont comprimées, insérées dans un cathéter pour être délivrées via l'artère fémorale au niveau de l'anneau aortique. La prothèse est déployée à l'intérieur de la valve aortique sténosée, soit par inflation d'un ballonnet sur lequel elle est comprimée soit par retrait de la gaine du cathéter si le stent est auto-expansible.

Le but de notre travail est de déterminer l'efficacité d'un traitement anticalcifiant (Xenologix), fréquemment utilisé sur le péricarde bovin, sur le péricarde porcin. Pour cela, nous comptons utiliser un modèle expérimental classique pour l'étude des dégénérescences des feuillets péricardiques utilisés dans la construction des bioprothèses.

Pour la réalisation de ce projet, des échantillons (disques de 6mm de diamètre) issus de péricardies porcine et bovine seront implantés dans les muscles paravertébraux de lapins pendant 75 jours. Le contenu en calcium des disques sera mesuré après explantations des échantillons. Chaque lapin recevra 8 disques (4 disques issus de porcine et 4 autres bovine) et ce projet utilisera au total 10 lapins.

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

3173. L'imagerie échographique ultrarapide est une nouvelle modalité d'imagerie qui permet d'observer de toutes petites vibrations qui se déplacent rapidement dans les tissus biologiques, ces vibrations étant invisibles par échographie conventionnelle car la cadence des échographes est trop basse pour pouvoir les observer. Cette approche permet de réaliser une cartographie de la dureté des tissus mais aussi de pouvoir suivre la contraction des tissus musculaires avec une résolution temporelle très haute. Le but de ce projet est d'appliquer au cœur cette nouvelle modalité d'imagerie qui a déjà été validée avec succès *in vitro*, *ex vivo* sur des tissus cardiaques et *in vivo* sur d'autres organes tels que le sein, la thyroïde et le foie. Les objectifs sont de démontrer qu'il est possible de quantifier par échographie 1) la rigidité myocardique ce qui facilitera ainsi le diagnostic d'insuffisance cardiaque diastolique et des cardiomyopathies ischémiques et 2) de cartographier à très haute cadence les délais d'activation mécanique lors de la contraction cardiaque, ce qui pourrait permettre à terme de mieux diagnostiquer et prendre en charge les dyssynchronies cardiaques. À terme, cette technique d'imagerie permettra de mieux diagnostiquer les patients atteints de pathologies cardiaques telles que l'insuffisance cardiaque diastolique, ce qui reste aujourd'hui très difficile à réaliser par les techniques d'imagerie existantes.

La technique a déjà été évaluée avec succès *in vitro* en laboratoire sur des gels et sur des tissus *ex vivo*. L'objectif de ce protocole est de démontrer sur un modèle ovin que l'imagerie des propriétés viscoélastiques de myocarde est faisable sur cœur battant et permet d'accéder à des paramètres de fonction cardiaque qui ne sont pas mesurables par d'autres techniques non invasives. Le recours à l'animal est donc justifié par la nécessité d'appliquer cette technique sur cœur battant dans des conditions physiologiques contrôlées. Les mesures échographiques seront réalisées sur cœur battant dans 3 conditions différentes : étude sur myocarde infarcté, étude sur myocarde sidéré et étude sur asynchronisme ventriculaire. Cette étude a été conçue en suivant la règle des 3R : la technique a d'abord été validée sur des gels et des tissus biologiques *in vitro*, le nombre d'animaux a été réduit au minimum possible (3 groupes de 7 animaux, soit 21 animaux au total) pour pouvoir établir une validation claire de la technique, et enfin le principe de raffinement a été respecté par la prise en charge de la douleur des animaux.

3174. La greffe rénale est le traitement de choix de l'insuffisance rénale terminale.

La pénurie d'organes nous incite à prélever des greffons dits marginaux particulièrement sensibles au stress oxydant généré par la séquence d'ischémie-reperfusion. En effet, lors du prélèvement puis de la greffe, le rein est soumis à différentes épreuves. Tout d'abord, le rein est séparé de la vascularisation lors du prélèvement chez le donneur. Il est donc privé d'oxygène - c'est la période d'ischémie. Puis, le rein est placé chez le receveur où il reçoit de nouveau du sang oxygéné - c'est la reperfusion. Le retour de l'oxygène après une période d'ischémie entraîne des réactions en chaîne à l'origine du stress oxydant, délétère pour les cellules. Nous avons pu démontrer sur un modèle de culture cellulaire que l'acide tannique offrait une protection significative contre les dommages engendrés par l'ischémie-reperfusion. Il est impossible d'évaluer de nouveaux traitements de l'ischémie-reperfusion en utilisant seulement le modèle *in vitro* car les effets de l'ischémie-reperfusion n'impliquent pas seulement de multiples types cellulaires, mais ils font aussi intervenir le système immunitaire ainsi que les facteurs de coagulation. À l'étape de notre étude le modèle *in vivo* est nécessaire. Nous allons donc étudier l'effet protecteur de l'acide tannique sur un modèle de transplantation rénale chez le rat. Au total nous avons besoin de 60 rats. Le critère de jugement principal sera la reprise de la fonction rénale (créatinine à J1, J3 et J7). Les critères secondaires seront cliniques, biologiques (dosage des Alarmines), histologiques et biochimiques avec étude du stress oxydant intra tissulaire.

Tous les animaux seront sous anesthésie générale pendant l'intervention chirurgicale et sous surveillance bi-quotidienne dans le suivi post-opératoire. Une analgésie per-opératoire et post-opératoire est prévue. Tous les animaux seront euthanasiés à la fin de l'étude par surdosage anesthésique.

3175. Les organismes nécessitent une représentation précise de leur environnement afin d'y répondre de manière appropriée (fuite/attaque, etc...). Chez l'homme, des déficiences dans la perception et la réponse aux stimuli de l'environnement provoquent des troubles psychiatriques (TDAH, autisme, schizophrénie). Ces représentations au sein du cerveau correspondent à des projections de neurones (axones) d'une aire cérébrale vers une autre prenant la forme de « cartes topographiques » (ou projections nerveuses ordonnées). Ces cartes sont des représentations géométriques de l'environnement. Elles se mettent en place au cours du développement et mûrissent au cours des premiers jours de vie chez la souris. La formation des représentations visuelles (ou rétino-topiques) est contrôlée par un certain nombre de molécules dont les récepteurs EphA et leurs ligands les ephrin-As. Préalablement nous avons identifié et caractérisé le rôle de ces récepteurs dans la mise en place de ces représentations à l'aide de souris génétiquement modifiées portant des mutations empêchant le

fonctionnement normal des récepteurs EphA. Nous avons pu ainsi élucider le mécanisme de formation de ces projections nerveuses et le rôle de ces récepteurs. Par contre, le rôle des ligands ephrin-A dans la mise en place des projections rétiniotopiques est controversé et pour clarifier cette incertitude, notre projet a pour but de caractériser des souris portant des mutations de ces ligands et d'étudier la mise en place de la rétiniotopie au cours du développement, par injection de traceurs à des âges de 1 ou 3 semaines et de génotypes différents. Un total de 150 souris par lignée (50 génotype sauvages, 50 hétérozygotes et 50 homozygotes) et 3 lignées de souris seront utilisées dans ce projet (aucune d'entre elles ne présentent de phénotype dommageable) suivant 2 procédures soit un total de 900 souris ( $150 \times 3 \times 2 = 900$ ) sera utilisé dans ce projet. Une approche *in vitro* n'est pas envisageable car ce projet a pour but d'étudier la mise en place de réseaux et de connexions nerveuses entre différentes aires du cerveau mettant en jeu des processus de compétition pour un espace défini non-modélisable *in vitro*. Toutes les dispositions seront par ailleurs prises pour limiter le nombre de souriceaux utilisés (raffinement de l'environnement pour limiter le cannibalisme après chirurgie sur les souriceaux à P7) et leur inconfort (anesthésie pour les procédures chirurgicales, suivi post-opératoire, raffinement de l'environnement). A terme, nos résultats permettront de caractériser le mécanisme de formation de ces représentations au sein du cerveau afin de mieux comprendre les liens causaux avec différentes maladies psychiatriques.

3176. Le point de départ du développement d'un cancer est l'altération du matériel génétique d'une des cellules de l'organisme. Cette altération entraîne un dysfonctionnement des cellules qui, progressivement, perdent le contrôle de leur prolifération, deviennent immortelles et se développent de façon anarchique dans l'organisme.

D'autre part, pour combattre les agressions extérieures (infection virale ou bactérienne) l'organisme se défend en activant son système immunitaire grâce à la mobilisation de plusieurs types de cellules et la production de molécules de défense.

Suite à ces deux faits, le concept d'immunothérapie est né, c'est-à-dire traiter le cancer en utilisant le système immunitaire. Le cancer n'est plus vu uniquement comme une maladie des gènes mais aussi comme une maladie de l'organisme, de l'environnement de la tumeur et du système immunitaire.

Très schématiquement, l'immunothérapie peut se résumer à deux pistes : 1) si le système immunitaire ne reconnaît pas la tumeur comme étrangère à l'organisme, il va falloir induire une réponse en l'éduquant, c'est-à-dire en lui apprenant à la reconnaître comme dangereuse, 2) si la réponse est là, mais pas assez forte, il s'agira alors de la stimuler, pour lui donner une dimension qui soit à la hauteur de son adversaire.

Le but de cette étude est d'induire une réponse immune grâce à l'injection d'une protéine P qui serait capable d'induire une « auto-vaccination » contre les tumeurs. Des données préliminaires, *in vitro*, suggèrent que cette protéine possède un mécanisme d'action innovant puisqu'elle agit comme un agent immunostimulant qui cible les cellules dendritiques du système immunitaire et induit leur activation/maturation.

Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée contribuent au bien être animal. Cette étude sera réalisée avec un nombre d'animaux réduit à minima, elle ne peut pas être remplacée par d'autres méthodes alternatives.

Le nombre total de souris est de 130.

3177. Notre but est de comprendre les mécanismes cellulaires perturbés par la prise d'alcool sous forme de binge (fortes doses répétées) et responsables des défaillances de mémoire chez les adolescents pratiquant le binge drinking. S'il est connu que l'alcool à hautes doses perturbe la mémoire chez l'adulte, peu de choses sont connus chez les jeunes sujets et notamment les mécanismes cellulaires responsables des défaillances mnésiques à court et à long terme. D'autre part, la sensibilité des sujets femelles par rapport aux sujets mâles est très mal documentée sur cet aspect alors que dans la population humaine, les filles rattrapent les garçons en ce qui concerne la consommation d'alcool. La mémoire chez l'Homme comme chez les animaux supérieurs est localisée dans la structure cérébrale appelée hippocampe et nécessite des interactions entre neurones dans cette structure. Il est donc nécessaire d'enregistrer les neurones de l'hippocampe dans un modèle expérimental conservant l'intégrité anatomique et fonctionnel de la structure. L'approche « *in vitro* » sur tranche d'hippocampe de rat, que nous utiliserons est ainsi la mieux adaptée pour répondre à nos questions. Afin de découvrir les cibles de l'alcool il nous faudra tester plusieurs substances pharmacologiques et donc étudier plusieurs groupes d'animaux (15 animaux par groupe pour observer des différences significatives entre les groupes). Douleur, souffrance et angoisse seront minimisées par un hébergement en milieu enrichi (stimulations sensorielles), en groupe (activités sociales) et en présence de musique diffusée dans la pièce de stabulation. Sur le plan expérimental le nombre total d'animaux sera de 4250 sur 3 ans. Les animaux recevront soit une, soit 2 doses d'alcool par jour à un intervalle de plusieurs heures afin de mimer la répétition des « binges » et nous étudierons après élimination de l'alcool (à +24h, +48h et +8jours), les effets des ivresses sur (i) les neurones de l'hippocampe enregistrés sur tranche maintenue en survie pendant 6h, (ii) les capacités d'apprentissage des animaux et (iii) les récepteurs à l'alcool dans l'hippocampe afin de déterminer son mode de fonctionnement au niveau des neurones. Ainsi nous prélèverons l'hippocampe dans des animaux dédiés pour analyse des récepteurs. Nous étudierons les animaux mâles et femelles afin de déterminer s'il existe une différence de sensibilité à l'alcool entre les sexes. Dans ce cadre, il faut déterminer le rôle de la puberté et donc tester des animaux en période pré et post pubère. Nous prévoyons également d'étudier le rôle du cycle ovarien chez les femelles pour définir quelle période du cycle est importante dans la sensibilité des femelles au binge drinking. Après détermination de la période du cycle dans laquelle la femelle se trouve (pro-œstrus ou œstrus) nous ferons les mêmes expériences d'électrophysiologie et de biochimie que précédemment. Ces dernières expériences nous permettront de déterminer si les hormones du cycle ovarien jouent un rôle dans la différence de sensibilité entre femelles et mâles lors des binges après la puberté.

3178. Une des capacités les plus impressionnantes du cerveau est sa faculté constante à apprendre et acquérir de nouvelles compétences, à intégrer de nouvelles expériences et à former des mémoires à long terme. Il est généralement admis que des changements dans les connexions synaptiques entre les neurones jouent un rôle-clé dans l'apprentissage et la mémoire. Le stockage à long terme des informations et leur stabilisation nécessitent une réorganisation structurale au sein de réseaux neuronaux, avec la formation de nouvelles synapses et l'élimination de connexions existantes.

Ainsi, la constitution d'un souvenir se joue dans la dynamique d'opérations impliquant l'hippocampe et des structures corticales. La consolidation d'une mémoire au niveau des systèmes repose sur un dialogue hippocampo-cortical conduisant au renforcement progressif des connexions corticales notamment celles du cortex préfrontal médian (CPFm). Cependant, la manière dont ces deux structures interagissent n'est pas clairement établie. Sur la base des données anatomiques et électrophysiologiques, les noyaux reuniens (Re) et rhomboïde (Rh) de la ligne médiane ventrale du thalamus pourraient être un relai critique dans le transfert d'informations du CPFm vers l'hippocampe. Chez l'Homme, les amnésies diencéphaliques (atteinte du thalamus) sont caractérisées par des déficits ressemblant à ceux observés dans les amnésies du lobe temporal (hippocampe) ou à celles impliquant le cortex préfrontal, ceci en fonction de la localisation de l'atteinte thalamique. Ces déficits pourraient être en relation avec, soit une déconnexion de l'hippocampe et du CPFm au niveau thalamique, soit la perte de la contribution de noyaux spécifiques thalamiques à ces systèmes.

La mise en évidence au laboratoire de l'implication de ces noyaux thalamiques dans la formation d'une mémoire spatiale ancienne mais pas dans celle d'une mémoire récente chez le Rat a permis de proposer pour la première fois, que la réorganisation d'une trace mnésique au niveau des systèmes se jouerait au sein d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique.

L'objectif global du projet est de poursuivre nos travaux et d'étudier, 1) la récupération fonctionnelle chez les rats lésés par un élevage en milieu enrichi dont on sait qu'il peut restaurer des capacités perdues après lésion cérébrale et les processus mis en jeu (procédure n°1) et, 2) d'approfondir nos recherches sur les processus/mécanismes sous-jacents aux effets de la lésion thalamique avec des marqueurs de plasticité cérébrale (procédures n°2 et 3). Une 4e procédure concerne la vérification des lésions en IRM (imagerie par résonance magnétique) juste après la chirurgie sur une partie des rats lésés des procédures 2 et 3. Le projet inclut 395 rats mâles adultes Long Evans. Les expériences prendront en compte la règle des 3R : 1er 'R', réduire le nombre d'animaux en fonction des expériences (comportement vs biologie moléculaire, rats lésés vs rats 'sham) pour une puissance statistique suffisante, soit 6 ou 12 rats témoins par groupe et 9 ou 18 rats lésés par groupe et le 2e 'R', 'raffiner' en réduisant au maximum la douleur (chirurgie), le stress ou l'anxiété des animaux par notamment l'habituation des rats aux procédures et dispositifs des tests.

3179. Ce projet a pour but de former les internes en chirurgie pour obtenir leur Diplôme d'Etudes Spécialisées de chirurgie viscérale.

Nous utilisons dans ce projet 16 porcelets landras de 50 kg (âgés de 3 ou 4 mois) par an (sur 5 ans), fournis par un éleveur agréé.

Le DES de chirurgie viscérale est composé de :

- La formation chirurgie digestive (3 sessions/an) : 2 techniques sont abordées (cœlioscopie et laparotomie)
- La formation chirurgie urologique (1 session/an) : 2 techniques sont abordées (cœlioscopie et laparotomie)

Nous utilisons donc 2 lots de porcelets:

- Lot N°1 pour la chirurgie digestive : 12 porcelets /an
- Lot N°2 pour la chirurgie urologique : 4 porcelets /an.

Soit un total de 80 porcelets pour 5 ans.

Plusieurs chirurgiens pratiquent sur le même porcelet (4 chirurgiens/porcelet) pour limiter le nombre d'animaux utilisés. Ce nombre sera revu à la baisse et uniquement à la baisse en fonction du nombre de chirurgiens inscrits aux formations.

Nous n'avons pas les moyens techniques, à ce jour, de remplacer cette formation par des méthodes in vitro ou in silico. L'anatomie du porcelet est un critère important mais aussi la mise en situation de stress du chirurgien par le risque vasculaire lié à la présence des gros vaisseaux vitaux. En cas de plaie des gros vaisseaux ce qui est le risque majeur chez l'homme (plusieurs morts par an chez les chirurgiens non entraînés), il faut savoir réagir immédiatement et aucun simulateur existant ne permet de réaliser cette situation qu'il faut contrôler en moins de 20 sec, car au-delà la vie est en danger.

Les porcelets sont considérés comme des patients humains. Tout est mis en oeuvre pour éviter tout stress et toute forme de souffrance.

Les porcelets sont transportés dans des conditions confortables, par un transporteur agréé, jusqu'au laboratoire. Dès leur arrivée, nous leur administrons des calmants (prémédication), pour leur éviter le stress des manipulations de transfert jusqu'au bloc opératoire.

Au bloc opératoire, ils sont mis sous anesthésie générale et sous respirateur pour leur confort respiratoire.

Nous leur administrons également des analgésiques pour éviter toute souffrance. Pendant toute la durée de l'intervention, les constantes (température, rythme cardiaque) sont surveillées.

A la fin de l'intervention, l'animal n'est pas réveillé et il est euthanasié par un surdosage d'anesthésique (pentobarbital sodique). C'est une procédure sans réveil.

3180. Ayant découvert que des molécules lipidiques peuvent empêcher une infection des cellules en culture par le virus de la dengue, nous souhaitons tester si ces composés protègent l'animal contre l'infection virale. Afin de mimer les différentes pathogénicités des virus de la Dengue chez l'homme, nous utiliserons des souris de laboratoire, dites sauvages, déficientes pour le récepteur à l'interféron de type I et déficientes pour la molécule RANKL. Les tests in vitro montrant l'efficacité de ces

molécules nous permettent de n'utiliser que 10 animaux par groupe, ce qui est le minimum nécessaire à une étude statistique fiable. Nous n'utiliserons qu'un groupe contrôle par type de souris. Le nombre total de souris est de 600. Tous les prélèvements et injections seront effectués sous anesthésie générale par des personnels compétents. Les animaux seront hébergés en groupe sociaux dans un environnement enrichi et observés quotidiennement. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement, et nous efforçons de réduire au mieux une éventuelle souffrance des animaux infectés.

3181. Avec la promotion de la pratique sportive régulière comme activité ayant des effets bénéfiques sur la santé par les autorités publiques, le nombre de pratiquants de sports de tout type croît régulièrement. Cette promotion de l'activité sportive a également conduit un grand nombre d'athlètes mais aussi de sportifs amateurs à s'initier aux marathons et à la pratique de sports intenses et prolongés comme les triatlons « Ironman », raid multi-sports ou ultra-trails.

Cependant, quelques études dans la littérature rapportent des effets potentiellement délétères de l'exercice intense et prolongé. Pour l'heure, ces altérations ne sont pas bien caractérisées. Il avait été supposé que ces altérations sont liées au remodelage cardio-vasculaire induit par l'entraînement. Néanmoins, il apparaît à la lecture du peu de données disponibles dans la littérature que ces altérations liées à la réalisation d'un effort intense et prolongé sont non liées ou même différentes des caractéristiques du « cœur d'athlète ». En effet, au repos, ces athlètes ne présentent pas d'altération contractile. Par contre, au cours de la récupération, ces athlètes développent une dysfonction contractile transitoire. Certains groupes ont même développé l'idée d'une cardiomyopathie induite spécifiquement par l'exercice intense et prolongé. Cette cardiomyopathie associe troubles électriques et troubles de la fonction contractile et de remplissage. Il apparaît donc important au vu de ces éléments de caractériser les effets de la pratique d'un sport intense et prolongé sur le système cardiovasculaire. L'effort demandé lors de ces pratiques sportives est difficile à reproduire en clinique et, seule l'investigation de terrain permettra de caractériser les conséquences sur les fonctions cardiaques de cette pratique sportive. Pour l'heure, aucun suivi ou surveillance/vigilance n'est recommandé pour ce type de pratique. L'effet intrinsèque sur le cœur et au niveau des cardiomyocytes reste à caractériser, tout comme la chronologie de ces événements.

La partie expérimentale de l'étude est basée sur l'utilisation de rats adultes (nombre estimé : 420 animaux sur 3 ans). Nous respecterons le principe des 3 R. Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux, nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous avons organisé nos expériences au mieux pour Réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données. Nous réaliserons sur les mêmes animaux des investigations in vivo et ex vivo. Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux, et pour apprécier au mieux les points limites : plusieurs expérimentations réalisées sous la même anesthésie (échocardiographie, chirurgie).

3182. Nous développons des approches de médecine régénérative pour traiter les maladies sévères du foie avec des hépatocytes.

La greffe de foie est le traitement reconnu pour de nombreuses maladies du foie au stade terminal mais, il y a pénurie de foies donateurs. La transplantation d'hépatocytes isolés de foies donateurs est une alternative prometteuse à la greffe de foie. Cependant, elle est limitée par cette même pénurie croissante d'organes donateurs et par l'incapacité à amplifier les hépatocytes in vitro.

Pour pallier ces difficultés, un nouveau concept thérapeutique a émergé visant à utiliser des cellules souches pluripotentes (CSP) induites (hiPS) et embryonnaires (hES) humaines comme une source illimitée de cellules du corps, notamment les hépatocytes. En effet, la multiplication et la transformation des CSPs en hépatocytes peuvent être contrôlées et obtenus en laboratoire. C'est sur ces propriétés que reposent les espoirs en termes d'applications biomédicales : constituer un réservoir renouvelable de cellules pour réparer les organes malades. Les hépatocytes issus des CSPs (pStemHep) sont capables de se greffer dans le foie et de guérir des animaux immunodéficients atteints d'une insuffisance hépatique aigüe (IHA) par un composé hépatotoxique. Le foie a une capacité extraordinaire de régénérer spontanément à partir des hépatocytes matures résidents. Ainsi, dans le cadre du traitement des IHA, l'idée est de soutenir transitoirement le métabolisme hépatique pendant la phase critique de régénération de la masse hépatique minimale vitale. Une fois cette phase franchie, le foie assurera lui-même la survie et le rétablissement de l'animal. Lorsque l'atteinte du foie est trop sévère et notamment lorsque sa capacité régénérative est déficiente, cette approche permettrait aux patients d'attendre une greffe de foie.

L'objectif de ce projet est de développer une approche basée sur les pStemHep pour traiter les IHA. Les objectifs spécifiques seront : (i) développer un protocole de production des pStemHep compatible en BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication ou GMP), (ii) améliorer les fonctionnalités des pStemHep afin d'augmenter leurs performances thérapeutiques pour traiter les IHA et (iii) développer des stratégies d'immunoprotection des pStemHep pour empêcher leur rejet immunitaire chez les animaux immunocompétents.

Les procédures mises en place nous permettront d'optimiser la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner). Lorsque des données préliminaires sont disponibles, nous les utilisons pour limiter le nombre de groupes expérimentaux dans les étapes suivantes. Cela permet de réduire le nombre d'animaux impliqués. Nous allons aussi réutiliser dans d'autres protocoles certains animaux non utilisés ou échantillons biologiques prélevés (comme le foie). Nous prendrons en compte tous les éléments nécessaires afin de limiter au maximum la douleur de l'animal.

Nous limiterons au maximum le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans à 1410 souris.

3183. Afin d'améliorer la durabilité de la production aquacole d'espèces carnivores comme les salmonidés, il est essentiel de réduire la part de farine de poisson, issue des pêches minotières, dans les aliments aquacoles. L'augmentation de la part de

glucides digestibles dans l'aliment semble être une bonne option tant d'un point de vue économique qu'environnemental. Toutefois, la truite est considérée comme un carnivore strict, utilisant comme principale source d'énergie les protéines alimentaires et faiblement adaptée à l'utilisation des glucides. Les conséquences en sont que lorsque la farine de poisson est substituée à plus de 20% par les glucides digestibles, cette espèce présente des baisses de performance de croissance et une hyperglycémie postprandiale persistante, définissant cette espèce comme intolérante au glucose. Une stratégie permettant d'adapter les animaux à leur futur environnement nutritionnel, i.e. riche en glucides digestibles ici, repose sur la programmation nutritionnelle précoce par un stimulus strictement nutritionnel ou non. Afin de programmer le métabolisme glucidique chez la truite et améliorer son utilisation des glucides alimentaires, nous proposons ici l'application précoce d'un stimulus avant le premier repas donc forcément non nutritionnel (il a été prouvé précédemment qu'un seul stimulus nutritionnel lors de l'alimentation précoce n'est pas suffisant pour programmer ce métabolisme) : l'hypoxie combinée à un stimulus hyperglycémique lors de la nutrition précoce. Les conditions d'hypoxie appliquées sont modérées et n'affecte pas la survie ni la croissance des poissons. Au total

1314 poissons seront utilisés. Les analyses d'expression de gènes/ d'activité enzymatiques/ de mécanismes relatifs au métabolisme glucidique seront faites sur des truites d'élevage (9 animaux par condition) sous deux conditions d'hypoxie (et un témoin en normoxie) et un régime riche en glucides digestibles (témoin avec un régime sans glucide).

Remplacement: les effets physiologiques escomptés (modification du métabolisme glucidique et meilleure utilisation des glucides alimentaires) ne peuvent être observés qu'in situ.

Raffinement : aucun prélèvement ne se fera sur animaux vivants

Réduction : le nombre de poissons prélevés est calculé ad minima compte tenu de la variabilité individuelle observée dans des analyses antérieures.

3184. Devant l'évolution des champs d'application de la thérapie génique, il devient urgent de développer des réactifs qui permettent un «targeting» localisé de biomolécules d'intérêt, et ce plus particulièrement pour les acides nucléiques non réplicatifs tels que les ARN messagers (ARNm) ou les ARN d'interférence (siRNA). Ces vecteurs sont de plus en plus utilisés car ils ne présentent pas les inconvénients liés à la recombinaison aléatoire qui peuvent être rencontrés avec l'ADN ou les particules virales. C'est pourquoi en tant qu'entreprise spécialisée dans le transport de biomolécules, nous souhaitons développer une gamme de produits de transport pour une distribution localisée de molécules biologiques. Dans cette étude menée sur 200 souris de type CD1 (indifféremment mâles ou femelles), nous nous proposons de coupler nos biomolécules d'intérêt (ARNm codant pour la luciférase ou siRNA couplé à la luciférase) avec nos molécules de transport de type lipide ou polymère. Ces complexes seront administrés par différentes voies d'injection (intraveineuse, intrapéritonéale, intramusculaire) et leur biodistribution sera étudiée par bioluminescence intravitale (méthode non-invasive permettant de réduire le stress et la souffrance de l'animal). Les molécules testées ont déjà toutes montré leur efficacité dans des modèles in vitro et présente un intérêt pour leur expérimentation in vivo (séquence chimique permettant un ciblage particulier, ou une protection accrue). Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum pouvant permettre de conclure à une spécificité et une reproductibilité de la procédure (4 animaux par condition expérimentale). Enfin, les animaux seront hébergés dans des conditions permettant de réduire leur stress et favoriser leurs interactions sociales (2 à 5 animaux de même sexe par cage, présence de petit abri pour pouvoir se cacher).

3185. La prévalence de l'obésité progresse dans le monde et ses complications (diabète de type 2, maladies cardiovasculaires, inflammation, cancers) deviennent désastreuses pour la santé publique. De nombreuses données épidémiologiques et cliniques soupçonnent fortement l'existence d'une programmation précoce au cours du développement périnatal de cette maladie. En effet, en dehors des causes génétiques et environnementales, les statuts nutritionnel, métabolique et endocrinien de la mère sont considérés comme des facteurs déterminants dans la genèse de l'obésité.

Des études ont montré qu'un régime hyperlipidique (High Fat Diet : HFD) induit une inflammation de bas grade, au niveau du système nerveux central et au niveau des autres organes, qui jouerait un rôle causal dans l'installation de la résistance à l'insuline associée à l'obésité. Ces effets pouvaient être également retrouvés chez la descendance de mères soumises à un tel régime.

Par ailleurs, il est actuellement admis que l'altération des sécrétions du tissu adipeux au cours de l'obésité joue un rôle crucial dans l'installation d'un état inflammatoire. Parmi ces sécrétions, la résistine (une adipokine) a récemment été suggérée pour son rôle dans l'induction de l'inflammation et de la résistance à l'insuline. Notre projet de recherche vise à déterminer l'impact de l'inflammation maternelle induite par un régime hyperlipidique ou par la résistine au cours de la période périnatale sur la prédisposition de la descendance à développer une insulino-résistance associée à une inflammation centrale et périphérique.

Des souris gestantes recevront donc un régime control ou HFD durant la gestation et la période de lactation et seront injectées ou non avec la résistine par voie sous cutanée. Le statut des descendants mâles et femelles sera étudié au sevrage et à l'âge adulte (après 4 semaines de régime contrôle et 6 semaines de régime HFD) pour étudier l'impact de la programmation maternelle à l'âge adulte.

Pour ce projet sur la programmation maternelle, il n'y a aucune possibilité de méthode alternative à l'expérimentation animale, seule l'utilisation d'animaux peut nous permettre de répondre à ce type de questions. De plus, tous les efforts ont été faits pour réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire pour avoir des résultats significatifs (analyses statistiques non paramétriques : Test de permutation et test Mann and Whitney). Au total nous partons sur 450 animaux sachant que l'étude comptera 6 lots au départ. Nous avons tenu compte de la variabilité individuelle généralement observée dans les protocoles nutritionnels, de la nécessité de panacher nos groupes à partir de plusieurs portées initiales et du sexe des

animaux. Notre connaissance et notre expérience dans ce domaine ainsi que notre analyse bibliographique poussée nous a permis d'évaluer au minimum le nombre d'animaux utilisés. De plus, la grande majorité des analyses seront faites ex-vivo sur des échantillons prélevés post-mortem. L'objectif de Raffinement a été pris en compte afin de s'assurer du bien-être des animaux, analgésiques et anesthésiques seront utilisés afin d'éviter leur souffrance. De plus, les souris seront enrichies et les animaux seront laissés en groupe tant que possible.

3186. Les recherches récentes témoignent d'une remarquable accélération dans la compréhension de mécanismes qui sous-tendent nos capacités d'apprentissage et de mémorisation. De nombreuses recherches montrent que la mémoire repose sur des modifications durables des réseaux neuronaux du cerveau activés lors de l'apprentissage, grâce aux propriétés de plasticité du cerveau qui impliquent le renforcement des connexions synaptiques par un mécanisme appelé « potentialisation à long terme » (PLT). Si certains des mécanismes de cette plasticité essentielle à la formation de souvenirs durables ont été identifiés, impliquant l'activation de protéines et à la régulation de gènes dans les neurones activés, ces connaissances sont encore très limitées. Or de nombreuses études montrent que les pertes de mémoire lors du vieillissement ou de maladies neurodégénératives ou psychiatriques sont associées à des altérations moléculaires de cette plasticité. Il est donc essentiel de mieux connaître les molécules qui sous-tendent cette PLT pour envisager des thérapies dans ces pathologies, une approche neurobiologique qui n'est possible que chez l'animal. Le but de ce projet est donc d'un intérêt sociétal majeur. Il aura pour objectif spécifique de caractériser le rôle de gènes et protéines neuronales dans cette PLT. Pour cela, de jeunes animaux adultes (180 rats Sprague Dawley) seront soumis à une PLT avec enregistrements électrophysiologiques dans l'hippocampe, une structure clé de la mémoire. De nombreuses études, y compris les nôtres, ont montré que cette plasticité est identique, et met en jeu les mêmes mécanismes, sous anesthésie et chez l'animal éveillé. L'étude sera donc réalisée sous anesthésie profonde afin d'éviter toute souffrance des animaux. Elle dure de 3 à 6 heures au cours de laquelle des stimulations de neurones et enregistrements électrophysiologiques sont réalisés. En fin d'expérience, les animaux sont euthanasiés et des études biochimiques des cerveaux post-mortem à différents temps après PLT (1, 2 et 4 heures) permettront de confirmer les bases physiologiques des hypothèses avancées dans la littérature. L'approche utilise des techniques qui ont montré leur pertinence dans les récentes publications sur les mécanismes de plasticité synaptique chez le rat. Des plannings rigoureux et la maîtrise technique des expérimentateurs permettent de réduire considérablement le nombre d'animaux à 220 (minimum 180) nécessaire au projet, conçu pour obtenir des statistiques valables à partir d'un nombre le plus limité possible d'animaux (tests adaptés aux petits échantillons). Les protocoles suivent strictement les procédures préalablement validées par le comité d'éthique (anesthésie, analgésie, euthanasie pendant l'expérience), et les soins apportés aux animaux (enrichissement et réduction du stress et des perturbations physiologiques au cours de la stabulation préalable à l'expérience, surveillance régulière depuis l'arrivée des rats au laboratoire jusqu'à la fin des expériences afin de détecter tout signe de souffrance ou mal-être impliquant l'arrêt de l'expérience, soins apportés aux animaux par manipulations quotidiennes et veille en continu du bien-être des animaux en préalable à l'expérimentation afin d'éviter ou de limiter au maximum toute souffrance physique ou psychologique.

3187. Les dernières années témoignent d'une remarquable accélération dans la compréhension des facteurs génétiques impliqués dans la déficience intellectuelle (DI), ou retard mental, et de nombreux gènes responsables ont été identifiés (>300 gènes). Toutefois, le lien entre les mutations à l'origine des DI et les dysfonctionnements cognitifs reste mal compris. Une hypothèse nouvelle considère que certaines mutations à l'origine des DI affecteraient la capacité du cerveau à produire de nouveaux neurones (neurogenèse dans le cerveau adulte), un processus qui permet au cerveau de se modifier au cours des apprentissages et qui joue donc un rôle crucial dans la mémoire. Notre objectif est d'entreprendre une analyse comparative de la neurogenèse adulte et des capacités d'apprentissage et de mémoire chez plusieurs souris modèles de maladies génétiques humaines associées à une DI : le syndrome de Coffin-Lowry, la dystrophie musculaire de Duchenne, et deux formes rares de déficience intellectuelle dues à des mutations dans deux gènes connus pour leur rôle crucial dans la mémoire. Des données convergent pour impliquer ces gènes dans différentes étapes de la neurogenèse et dans la détérioration des capacités cognitives dans ces modèles. Notre projet déterminera avec précision la nature de ces altérations et permettra d'identifier de nouvelles cibles pour des approches thérapeutiques dans ces pathologies.

Les souris génétiquement modifiées requises pour ce projet sont les seuls modèles animaux de ces pathologies et les corrélations entre mécanismes cellulaires et moléculaires du cerveau et capacités d'apprentissage ne peuvent pas être étudiées directement chez le patient et impliquent une approche in vivo. La complexité des mécanismes cérébraux impliqués ne peut pas non plus être abordée avec des cultures de cellules ou des approches in silico. De nombreuses expériences comportementales comparatives et contrôles doivent être effectuées sur ces différents modèles de souris et l'effectif maximal de souris nécessaires à l'accomplissement du projet est de 2142 (minimum 1528). Afin de limiter le nombre de souris, des tests statistiques adaptés aux petits échantillons seront appliqués et les premières expériences auront pour but de démontrer la présence d'altérations de la neurogenèse dans ces modèles. Si un modèle ne présente aucune altération, les expériences visant à préciser la nature des mécanismes responsables seront inutiles et le nombre de souris en sera d'autant réduit. L'approche expérimentale utilise des stratégies et techniques qui ont montré leur pertinence dans les récentes publications sur l'étude des corrélations entre mécanismes de neurogenèse et processus cognitifs chez la souris, et le projet a obtenu plusieurs sources de financement témoignant de sa pertinence et de sa faisabilité. Les procédures sont en accord avec des protocoles validés par le comité d'Ethique (anesthésie, analgésie, euthanasie, chirurgie, réduction du stress au cours des tests comportementaux) et les soins apportés aux animaux (manipulations préalables à l'expérimentation, observation régulière

des souris pour détecter des signes de détresse ou de souffrance impliquant l'arrêt de l'expérience) sont conçus pour éviter ou limiter au maximum toute souffrance physique ou psychologique.

3188. Les comportements qui apparaissent face à un stimulus aversif sont très semblables d'un individu à l'autre et ces derniers sont contrôlés par l'amygdale, une structure cérébrale profonde, très conservée au sein de l'évolution et essentielle dans le traitement des émotions. Elle est importante pour la reconnaissance de la signification émotionnelle de stimuli, la mémoire à long terme d'associations saillantes et émotionnelles, ainsi que l'orientation vers des stimuli sociaux. Elle semble moduler nos réactions à des événements qui ont une grande importance pour notre survie.

La phase de développement périnatale est une phase particulièrement sensible au stress dont l'impact est visible chez l'adulte. Un dysfonctionnement de l'amygdale au cours du développement pourrait être à l'origine d'un développement modifié des connectivités neuronales ce qui pourrait donc avoir des conséquences comportementales à long terme chez l'adulte, en particulier dans les comportements émotionnels. Le but est donc de comprendre les mécanismes responsables de dérèglements émotionnels au cours du développement.

Pour cela, nous étudierons l'impact d'une sur-activation développementale de l'amygdale sur les comportements de type anxieux et émotionnels chez le rat jeune et adulte, ainsi que sur l'activité neuronale et la plasticité d'un réseau amygdalien pendant un apprentissage aversif. La sur-activation de l'amygdale sera réalisée grâce à l'injection d'un lentivirus qui agit sur la machinerie cellulaire et synaptique. L'injection sera faite à différents âges (juvénile PN6-8, adolescent PN25-30 et jeune adulte) afin de mettre en évidence une corrélation entre le développement et les conséquences d'une sur-activation amygdalienne. Pour ce projet, nous utiliserons un maximum de 756 rats (adultes et adolescents) et 129 mères (pour produire 378 ratons mâles et 24 ratons mâles ou femelles pour mise au point) pour étudier l'effet chez le rat juvénile. Ces rats seront séparés en trois grands groupes : un groupe pour mesurer l'activité cérébrale lors des processus de mémorisation émotionnelle chez l'animal éveillé, un autre groupe pour mesurer la plasticité de l'amygdale chez l'animal anesthésié et un dernier groupe qui sera étudié du point de vue comportemental pour caractériser l'état émotionnel et anxieux de l'animal. Pour chacun des groupes, on séparera les rats en 3 sous-groupes: 2 sous-groupes recevront une injection de virus actifs différents et un recevra une injection de virus inactif (groupe contrôle), pour un total de 126 animaux/virus/âge.

La règle des 3R est suivie de la manière suivante : (1) Le nombre d'animaux utilisés est minimisé autant que possible par l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal (enregistrement simultané de plusieurs structures cérébrales). (2) Nous réduisons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes, et utilisons anesthésie et analgésie avant chaque procédure chirurgicale de façon adaptées à l'âge et au poids de l'animal. Les animaux sont logés avec de l'enrichissement autant que possible. Chaque animal est suivi tout au long de sa vie, en particulier après les procédures chirurgicales, afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie. (3) Ce projet de recherche fondamentale fait partie des Neurosciences comportementales et nécessite des interventions intracérébrales (injection de virus et enregistrements neuronaux), ce qui ne peut se faire que chez l'animal, ainsi que l'étude de l'activité cérébrale et des comportements émotionnels déjà bien caractérisés chez le rat.

3189. Les maladies auto-immunes résultent d'un dysfonctionnement du système immunitaire qui s'attaque aux propres constituants de l'organisme. Les causes sont multifactorielles de type génétique, environnemental (agents infectieux, agents toxiques, médicaments) et hormonal. Plus de 80 maladies auto-immunes sont décrites à ce jour dont l'étiologie reste essentiellement inconnue. Dans leur ensemble, elles représentent la 3ème cause de morbidité dans les pays développés et affectent 5 à 7% de la population. Une meilleure compréhension de leur physiopathologie est nécessaire pour améliorer les traitements. Le lupus érythémateux disséminé/systémique (LED) est une maladie auto-immune chronique responsable d'atteintes tissulaires multiples (peau, reins, poumons) dont les manifestations cliniques sont très variées. Bien que de nombreuses anomalies de l'immunité aient été caractérisées, ainsi qu'une dizaine de loci de susceptibilité, la physiopathologie du LED reste mal connue car complexe. Les souris de cette étude constituent un modèle exceptionnel de la maladie humaine puisqu'elles développent spontanément des atteintes cutanées, pulmonaires, rénales et articulaires dues à des infiltrations lymphoïdes et des titres élevés en auto-anticorps. Ces auto-anticorps sont responsables chez les souris de glomérulonéphrites qui, chez l'Homme, sont la complication la plus grave du LED. Ces souris présentent des taux sériques anormalement élevés de cytokines ce qui en fait un modèle de choix pour étudier l'importance des cytokines dans le développement du LED. Comme dans l'espèce humaine, les souris de ce projet présentent un fort dimorphisme sexuel, les femelles étant plus touchées que les mâles. La sévérité des atteintes tissulaires du LED est le plus souvent contrôlée par des corticoïdes et/ou des immunosuppresseurs. Cependant, leur utilisation au long cours altère les réponses immunitaires engendrant un risque infectieux important. Cette lignée de souris est un modèle unique pour évaluer l'efficacité de nouveaux traitements ainsi que leur mécanisme d'actions d'autant plus qu'il est impossible de reproduire in vitro la complexité des interactions cellulaires à l'œuvre lors des réponses immunitaires normales ou pathologiques. L'élevage de ces souris permettra: 1) d'analyser les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables des processus inflammatoires physiologiques et pathologiques ; 2) de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques (études précliniques). Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, les groupes expérimentaux sont constitués de souris dont le sexe, l'âge et le stade de la maladie sont bien définis. Chaque groupe est ainsi constitué de 12 souris (6 de chaque sexe) comprenant des souris âgées de 8 et 14 semaines soit avant et après le développement des pathologies. Chaque expérience comprend trois groupes expérimentaux : "témoin non-traité", "placebo", "substance étudiée" soit 36 souris/question scientifique posée. Chaque étude préclinique comprend 3 groupes de plus qui reçoivent différentes doses de la substance étudiée soit 72 souris/étude préclinique. Cinq expériences et deux études précliniques d'une durée de 2 à 4 mois sont prévues chaque année. Un nombre maximal de 1800 souris, en incluant les



animaux reproducteurs, sera nécessaire pour la réalisation de l'ensemble du projet (durée 5 ans). L'état général des souris est observé quotidiennement et elles sont euthanasiées dès qu'il présente une altération importante incompatible avec toute expérimentation (syndrome cachectique avec perte rapide de poids).

3190. L'obésité est une pandémie mondiale dont la prévalence croît de manière alarmante. Une étude épidémiologique a montré qu'en 2008 un adulte sur dix était obèse dans le monde. L'obésité et ses complications (diabète, maladies cardiovasculaires, inflammation, cancers) deviennent de véritables fléaux pour la santé publique. Les causes sont multiples : sédentarité, alimentation déséquilibrée, origine génétique. Depuis quelques années, les scientifiques ont également mis en évidence un effet de l'alimentation maternelle durant la grossesse et l'allaitement sur la prédisposition de l'enfant à devenir obèse. En effet, durant ces périodes, via le placenta (et le lait maternel), le fœtus (et le nouveau-né) est en contact avec les nutriments et hormones maternelles. De nombreuses données épidémiologiques et cliniques ont ainsi montré qu'une alimentation maternelle déséquilibrée constituait un élément déterminant dans la genèse de l'obésité chez la descendance.

La compréhension des mécanismes moléculaires sous-tendant cette « programmation » précoce de l'obésité nécessite de manipuler la nutrition maternelle et donc nécessite l'utilisation de modèles animaux. Chez les rongeurs comme chez l'homme, un environnement précoce hyperléptinémique, lié à un régime maternel hyperlipidique, constitue un facteur de risque prédisposant à l'obésité. Des études menées chez le rat ont permis d'établir qu'un tel régime pouvait modifier durablement l'organisation des réseaux neuronaux hypothalamiques impliqués chez l'adulte dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Le concept d'empreinte métabolique propose donc que l'alimentation maternelle influencerait la mise en place des circuits neuronaux hypothalamiques contrôlant la balance énergétique au cours du développement pré- et/ou postnatal.

Dans notre projet, nous faisons l'hypothèse que les micro-ARN, une classe fondamentale de régulateurs de l'expression génique, notamment au cours du développement neuronal, contribuent à l'établissement des réseaux neuronaux du contrôle de la balance énergétique. Ce projet de recherche qui permettra de caractériser des acteurs clés de cette « programmation » précoce est basé sur des manipulations alimentaires qui ne peuvent être conduites que sur un modèle rongeur (ici *Rattus norvegicus*). Nous produirons des portées de rats Wistar (240 adultes mâles et femelles) dont la vie fœtale et néonatale se sera déroulée sous régime contrôle ou hyperlipidique. Les animaux seront sevrés au régime contrôle et euthanasiés à 4 et 8 mois. 240 est le nombre minimum pour une analyse statistique fiable de 24 groupes d'animaux (3 régimes maternels dont 2 hyperlipidiques, 2 sexes, 2 âges, 2 régimes de la descendance). Dans un souci de raffinement, nous veillerons en continu au bien-être de l'animal. Nous suivrons leurs poids et prise alimentaire tout au long de leur vie. L'utilisation d'anesthésie nous permettra de diminuer la douleur et le stress de l'euthanasie.

Les cerveaux seront prélevés et les structures hypothalamiques d'intérêt microdisséquées. Les profils d'expression des micro-ARN seront analysés en fonction du régime maternel, du sexe et du noyau hypothalamique. La localisation cellulaire des micro-ARN sera réalisée par hybridation *in situ* fluorescente (FISH) sur coupe d'hypothalamus. Enfin, des organes et tissus centraux ou périphériques seront prélevés afin d'étudier le statut endocrinien et métabolique de l'animal.

3191. L'état de stress post traumatique (ESPT) est une pathologie invalidante, touchant des personnes exposées à un traumatisme intense, tel un viol ou un accident. Elle se caractérise entre autre par de fréquentes reviviscences de l'événement traumatique souvent provoquées par des indices liés à celui-ci. L'ESPT induit de plus de nombreux symptômes -perturbation du sommeil, anxiété, dépression- qui ne s'avèrent que partiellement sensibles à la plupart des traitements, que ce soit les antidépresseurs, les anxiolytiques, ou les thérapies cognitivo-comportementales. Un des enjeux majeurs reste donc le développement de traitements efficaces, permettant de renverser les modifications comportementales et physiologiques, dans le but de soigner les patients et de prévenir les fréquentes rechutes.

Nous proposons de considérer l'état de stress post traumatique, non comme une pathologie du stress, mais comme une pathologie de la mémoire, dont l'origine serait centrée sur les reviviscences du traumatisme, et de développer de nouvelles approches thérapeutiques impliquant un remodelage du souvenir traumatique.

Pour réaliser cet objectif, il est pour l'instant indispensable de passer par un modèle animal d'ESPT. Nous utiliserons le Single Prolonged Stress (SPS) chez le rat, car c'est un modèle largement utilisé dans la littérature, permettant le développement de nombreux symptômes reproduisant ceux observés chez l'homme. Notre projet a trois buts principaux : (1) démontrer l'importance des reviviscences dans le développement de la pathologie, (2) caractériser les circuits cérébraux activés lors des reviviscences par des techniques non invasives d'imagerie post-mortem, et (3) à explorer de nouvelles pistes thérapeutiques consistant à utiliser la malléabilité des souvenirs réactivés pour modifier leur valeur émotionnelle.

Pour réaliser ces objectifs, nous utiliserons environ 464 rats mâles de souche Sprague Dawley sur une période de 2 ans, dont la moitié sera soumise au traumatisme. Le nombre des animaux a été étudié au plus juste. Lors de l'application du traumatisme, tout sera mis en œuvre pour que l'inconfort des animaux soit réduit au maximum. Lors du traumatisme, le comportement des animaux sera minutieusement observé et des points limites ont été définis pour chacune des étapes. Le modèle de traumatisme induit un stress important chez l'animal, mais toutes les précautions sont prises pour que son application ne soit pas douloureuse. Dans les semaines qui suivent, l'état général des animaux est régulièrement suivi (aspect corporel, poids, comportement). Les animaux sont soumis à des tests comportementaux permettant de quantifier l'anxiété et l'émotivité des animaux. Les traitements envisagés impliquent une réactivation du traumatisme associée à des injections pharmacologiques visant à réduire l'émotivité des animaux. Ce programme devrait permettre la mise au point rapide de nouvelles approches thérapeutiques chez l'homme, basées sur des hypothèses novatrices et simples à mettre en œuvre. Nous espérons pouvoir, à relativement court terme, accroître l'efficacité des thérapies cognitivo-comportementales.

3192. Les gliomes sont les tumeurs du cerveau les plus fréquentes chez l'adulte. Malgré les progrès réalisés sur leur caractérisation, les stratégies thérapeutiques visant les gliomes restent peu efficaces. Après extraction par chirurgie, ces tumeurs peuvent être mises en culture in vitro, permettant ainsi leur caractérisation moléculaire et l'étude de leur évolution sous l'effet de différents traitements. Nous nous intéressons à deux gènes d'une même famille exprimés dans le cerveau : l'un est déjà identifié comme favorisant le développement des tumeurs alors que nous soupçonnons que l'autre aurait un rôle opposé, en empêchant la croissance des tumeurs.

Nous avons utilisé un modèle in vitro de culture de cellules de glioblastomes provenant de patients opérés, que l'on peut maintenir dans un état prolifératif ou orienter vers l'arrêt de la prolifération. Les résultats très encourageants que nous avons déjà obtenus in vitro nous ont permis de conforter notre hypothèse et nécessitent une validation expérimentale chez l'animal. En effet les gliomes sont des tumeurs dont la croissance peut être favorisée par le micro -environnement dans lequel elles se développent, et qui ne peut être strictement reproduit dans des cultures cellulaires in vitro. Cette validation sera basée sur l'analyse de la croissance tumorale in vivo des cellules de glioblastome humain, cellules dont on aura soit diminué soit augmenté l'expression des deux gènes d'intérêt. Cette étape d'analyse de la croissance tumorale chez l'animal est indispensable dans l'optique du développement de stratégies futures anti-tumorales à l'aide de molécules chimiques chez l'homme.

Les études réalisées préalablement sur les cellules en culture in vitro permettront de présélectionner des stratégies expérimentales efficaces, ce qui permettra de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés.

L'étude que nous proposons requiert l'utilisation de 360 souris. La croissance tumorale des cellules sera évaluée dans des souris, après injection au niveau du flanc, par la mesure bi-hebdomadaire du volume de la tumeur, cette mesure étant non invasive et sans douleur pour l'animal. Dans un souci de raffinement, toute souffrance et stress au moment de l'injection par voie sous-cutanée de cellules tumorales seront évités par l'utilisation de produits anesthésique et la croissance tumorale ne devra pas entraîner de douleur. Dans cette optique, nous avons défini un volume tumoral au-delà duquel les animaux seront euthanasiés. Nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'ajout d'enrichissement tel que coton, plaque à ronger ou cabane en carton, et surveillerons attentivement l'état de santé des animaux par une observation quotidienne et attentive de leur aspect physique et de leur comportement.

Les protocoles seront préalablement approuvés par le comité d'éthique et tout sera mis en œuvre pour assurer le bon état de santé des souris et le respect des points limite, en concertation avec le vétérinaire et la cellule « bien-être animal » de notre Institut.

3193. L'implant cochléaire est un dispositif mis en place chez le sujet humain atteint de surdité profonde lorsque les aides auditives classiques (« contours d'oreilles ») ne peuvent plus améliorer l'audition d'un sujet. Initialement, l'implant cochléaire a été préconisé pour des sujets non-âgés devenant sourds à l'âge adulte. Actuellement, de plus en plus d'implantation se font chez le sujet âgé (<70ans) mais également chez le très jeune enfant atteint de surdité congénitale. La population de sujets porteurs d'implants cochléaires est en croissance exponentielle; on l'estime actuellement à plus de 324 000 personnes dans le monde et le million sera atteint d'ici 1-2 ans. L'objectif de ce projet est de tester les stratégies de stimulation utilisées sur les implants. Pour cela il est indispensable de travailler in vivo chez l'animal porteur d'un implant. Dans ce projet 90 cobayes âgés de 6 mois, 12mois et 24-36 mois seront implantés (30/groupe d'âges afin de valider nos résultats sur des animaux jeunes mais aussi atteints de pertes liées au vieillissement) avec des implants cochléaires similaires à ceux utilisés chez l'humain. Sur chaque animal, nous évaluerons les réponses physiologiques à trois niveaux de traitement (le nerf auditif, du tronc cérébral auditif et du cortex auditif) ce qui contribuera à diminuer le nombre d'animaux utilisés. Les animaux seront enregistrés sur plusieurs mois ce qui contribuera aussi à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Les animaux seront hébergés au sein d'une colonie de 30-50 animaux où ils ont des interactions sociales et où ils disposent d'un milieu enrichi. L'utilisation d'antalgiques et analgésiques locaux lors de la pose de l'implant sous anesthésie générale profonde permettront de réduire au maximum la souffrance pour l'animal. Les expériences seront arrêtées au cas où une perte de poids de plus de 20%, une hyper-réactivité ou des vocalisations importantes lors des manipulations, ou bien des troubles de la locomotion. L'ensemble des manipulations utilisent des procédures préalablement validées. Les résultats obtenus permettront de mieux adapter des stratégies de stimulation afin d'avoir des implants cochléaires plus efficaces pour mimer l'intensité des sons de l'environnement.

3194. Les leucémies aiguës myéloïde (LAM) sont très hétérogènes tant dans leurs phénotypes que dans leur présentation clinique ou leur réponse aux traitements. Nous voulons étudier l'hétérogénéité phénotypique des LAM et son implication dans le développement de la maladie et dans la réponse aux traitements. Des tests in vitro ont déjà été réalisés au laboratoire sur des lignées cellulaires humaines de LAM et sur des cellules de patients atteints de LAM. Cependant l'apparition d'une LAM et les mécanismes de résistance aux traitements impliquent des interactions entre les cellules leucémiques et la niche de la moelle osseuse qu'il nous est impossible d'étudier in vitro.

Pour étudier ces mécanismes, nous voulons, dans un premier temps, induire une LAM, par injection de cellules cancéreuses de patients, dans des souris immunodéficientes NOD scid gamma. Les souris auront un suivi visuel pendant toute la durée de l'expérience pour détecter une éventuelle perte de poids ou un comportement anormal (signes pouvant conduire à l'euthanasie des animaux pour leur éviter de souffrir) et des échantillons de sang seront prélevés toutes les deux semaines pour suivre l'apparition de la leucémie. En fin d'étude, les souris greffées seront euthanasiées et nous récupérerons différents organes à partir desquels nous isolerons les cellules. A partir de ces cellules, nous analyserons le pourcentage de cellules leucémiques humaines, leur différenciation, ainsi que la présence des différentes sous-populations observées au diagnostic du

patient. Nous effectuerons aussi une analyse histopathologique des organes, ainsi que des analyses génomiques et transcriptomiques. Une partie des cellules de la moelle osseuse ou de la rate des souris sera réinjectée à de nouvelles souris NOD scid gamma receveuses afin d'établir des greffes en séries (secondaires et tertiaires). Le même suivi et les mêmes analyses que précédemment citées seront effectués sur ces souris secondaires et tertiaires. L'ensemble de ces analyses nous permettra d'établir une hiérarchie dans les différentes sous-populations de cellules leucémiques et de mettre en évidence leur capacité leucémogène. De plus, cette première partie nous permettra d'évaluer la faisabilité d'établir un modèle de xénogreffe de LAM similaire à la LAM du patient afin de valider son utilisation pour la seconde partie du projet.

Dans un deuxième temps, des traitements chimio thérapeutiques seront réalisés sur les animaux greffés, afin d'évaluer la résistance aux traitements et de comprendre l'implication dans cette résistance des sous-populations phénotypiques présentes au diagnostic chez le patient. Les mêmes critères de surveillances s'appliqueront à ces souris afin de définir un point limite pouvant conduire à l'euthanasie des animaux.

Pour cette grande étude de 5 ans, nous évaluons le nombre total de souris nécessaires à 2 395.

3195. L'apprentissage du temps (par exemple, quand une nourriture est accessible) est cruciale pour la survie. L'amygdale, une structure cérébrale profonde et très conservée au sein de l'évolution, semble moduler nos réactions à des événements qui ont une grande importance pour notre survie. Elle pourrait donc être cruciale dans la détection d'un changement du moment où la nourriture est accessible. Il est donc important d'en comprendre les bases neurobiologiques.

Le but de ce projet est d'étudier le rôle de différents noyaux de l'amygdale dans la détection d'un changement de règle temporelle dans une situation où une action à un moment donné est nécessaire à l'obtention de nourriture. Nous chercherons d'abord à caractériser comportementalement chez le rat les effets de surprise ou de frustration lorsque le moment d'accès à la nourriture est modifié (plus tôt ou plus tard). Nous testerons ensuite le rôle de deux noyaux de l'amygdale par une étude de marqueurs moléculaires et l'effet d'un blocage pharmacologique de plasticité.

Pour ce projet, nous utiliserons un maximum de 396 rats mâles adultes pour l'ensemble des trois séries expérimentales. Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal.

La règle des 3R sera suivie de la manière suivante : (1) Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. (2) Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes, et utiliserons anesthésie et analgésie avant chaque procédure chirurgicale de façon adaptée au poids de l'animal. Les animaux seront logés avec de l'enrichissement autant que possible. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience, en particulier après les procédures chirurgicales, afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation. (3) Ce projet de recherche fondamentale fait partie des Neurosciences comportementales et nécessite des interventions intracérébrales (injection de composé pharmacologique), ce qui ne peut se faire que chez l'animal, ainsi que l'étude de comportements déjà bien caractérisés chez le rat.

3196. Parmi les nombreuses approches thérapeutiques développées ces dernières années dans différents modèles animaux de la myopathie de Duchenne, celles qui relèvent de la thérapie génique offrent l'espoir d'une application prochaine au traitement des patients, et certaines font déjà l'objet d'essais cliniques. Cependant, la possibilité que ces traitements puissent corriger les altérations cérébrales et cognitives des patients, en plus de la dégénérescence musculaire, reste très peu étudié, alors qu'il s'agit d'un handicap supplémentaire sévère chez au moins un tiers des patients. Les explorations précliniques sont initialement menées sur des souris déficientes en dystrophine, une protéine qui est responsable de cette maladie et qui s'exprime normalement à la fois dans le muscle et le système nerveux. Notre projet a pour but d'évaluer plusieurs outils moléculaires susceptibles d'avoir des effets thérapeutiques dans le cerveau, chez la souris déficiente en dystrophine. Les traitements seront administrés sous anesthésie profonde soit par voie intraveineuse soit au cours d'une chirurgie du cerveau, et leurs effets seront ensuite évalués à l'aide de tests comportementaux dans les semaines qui suivent le traitement, et par des analyses moléculaires/biochimiques post-mortem. Ces outils ont été validés dans des études princeps qui ont montré l'absence de toxicité à des doses thérapeutiques transposables à l'Homme. Les chirurgies et tests fonctionnels seront effectués suivant des protocoles préalablement approuvés par le comité d'éthique et tout sera mis en œuvre pour assurer la surveillance de l'état de santé post-opératoire des souris et le respect des points limites, en concertation avec le vétérinaire et la cellule « bien-être animal » de notre institut. Le nombre maximal de souris nécessaire à cette étude est de 138.

3197. Parmi les nombreuses approches thérapeutiques développées ces dernières années dans différents modèles animaux de la dystrophie musculaire de Duchenne, celles qui relèvent de la thérapie génique offrent l'espoir d'une application prochaine au traitement des patients, et certaines font déjà l'objet d'essais cliniques. Cependant, la possibilité que ces traitements puissent corriger les altérations cérébrales et cognitives des patients reste très peu étudié, alors qu'il s'agit d'un handicap supplémentaire sévère chez au moins un tiers des patients. Les mutations qui affectent une forme cérébrale courte de la dystrophine sont associées aux retards mentaux les plus sévères. La perte de cette protéine, dont le rôle reste encore très mal compris, conduirait à une altération de la vascularisation cérébrale. Nos collaborateurs ont récemment produit de nouveaux vecteurs capables de véhiculer la totalité de la séquence ADN de cette protéine, relativement courte, et d'assurer sa ré-expression. Les études initialement menées dans la rétine ont montré qu'après traitement, la protéine s'exprime à nouveau et permet de rétablir des fonctions vasculaires normales.

Notre projet a pour but d'adapter ces nouveaux outils moléculaires au cerveau, de les utiliser pour mieux comprendre le rôle de cette protéine et de déterminer le potentiel thérapeutique de sa ré-expression. Les traitements seront administrés à des souris qui n'ont pas cette protéine, sous anesthésie profonde, soit par injection intraveineuse soit au cours d'une chirurgie du

cerveau, et leurs effets seront ensuite évalués à l'aide de tests comportementaux dans les semaines qui suivent le traitement, et par des analyses post-mortem des cerveaux. La petite séquence codante de la protéine sera véhiculée par un vecteur inactivé permettant un apport exogène de la protéine manquante. Différentes constructions génétiques seront initialement comparées pour sélectionner l'outil le plus performant. Les chirurgies et tests fonctionnels seront effectués suivant des protocoles ayant préalablement été approuvés par le comité d'éthique et tout sera mis en œuvre pour assurer la surveillance de l'état de santé post-opératoire des souris et le respect des points limites, en concertation avec le vétérinaire et la cellule « bien-être animal » de notre institut. Le nombre maximal de souris dans cette étude est de 610 souris. Si des vecteurs sont jugés inefficaces à une forte dose lors d'expériences préliminaires, l'étude à des doses plus faibles n'aura pas lieu, ce qui réduira le nombre de souris dans cette étude.

3198. Les maladies neurodégénératives sont un problème de santé public majeur. Parmi les traitements palliatifs possibles, la pratique d'une activité cognitive régulière visant à limiter la mort neuronale est très utilisée. Ces tâches cognitives permettent de maintenir un niveau d'activité cérébral important qui permet probablement la mise en place de mécanismes favorisant la survie des neurones. Cependant cette survie dépendante reste mal comprise puisque les neurones concernés sont difficilement identifiables. Est-ce que les neurones actifs sont les seuls à survivre? Comment cette survie spécifique se répercute sur l'activité cérébrale? Quel type d'activation est le plus adapté pour optimiser cette survie?

Dans ce projet nous étudierons cette problématique dans le système olfactif. Nous disposons d'une souche de souris génétiquement modifiée de façon non dommageable, pour laquelle une population précise de neurones olfactifs, qui est activée par une odeur connue, possède une molécule fluorescente et est donc facilement identifiable. Nous réaliserons des études de biologie moléculaire et cellulaire, et de l'imagerie sur des animaux qui ont préalablement réalisés des tests d'apprentissage à base d'odeurs.

Notre étude s'intéresse à des processus cognitifs et à des mécanismes de plasticité à long terme; elle ne peut pas être réalisée sur des modèles "in silico" ni sur des cultures de cellules.

Sur les 5 années du projet, nous utiliserons un total de 600 souris environ. Dans un souci de raffinement, nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'utilisation d'analgésie et d'anesthésie lors des procédures chirurgicales, et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement. La définition des critères d'arrêt se base sur au moins une des observations suivantes : baisse du poids supérieur ou égale à 20% du poids normal de ces animaux au même âge, hyperréactivité lors de la manipulation, comportement de prostration, vocalisations sonores spontanées ou lors de la manipulation, signes d'absence de toilettage (poil hirsute, pelage sale), troubles de la locomotion.

3199. Ce projet constitue une étude comparée, entre l'homme et le primate non-humain, des mécanismes cérébraux de la communication vocale. Par exemple, la reconnaissance des vocalisations de ses congénères et de leur identité est une faculté que l'on partage avec les primates non humains. Ceci n'est pas surprenant compte-tenu de l'importance de telles capacités cognitives pour créer et maintenir des interactions sociales. Sans compter l'impact d'une telle étude sur notre connaissance des processus cérébraux de la communication et de ses dysfonctionnements (autisme, prosopagnosie, phonagnosie...), ce projet participerait grandement à la recherche sur les origines du langage, aujourd'hui en plein essor. Le langage humain se serait-il développé à partir d'une communication non verbale plus primitive? Pour répondre à une telle question il est nécessaire de distinguer ce qui est spécifique à l'homme de ce qui est aussi présent chez des espèces phylogénétiquement proches, tels que les primates.

L'IRM fonctionnelle est une méthode idéale pour ce projet puisqu'elle a fait l'objet de nombreuses publications sur la perception de la voix chez l'homme, qu'elle faciliterait donc la comparaison inter-espèces dans le cadre de son utilisation chez le primate non humain (PNH), et qu'elle n'est pas invasive. Nous avons pour objectif d'utiliser cette technique chez le macaque Rhésus (n=5) éveillé, dans un protocole de stimulation auditive passive. Notre étude permettra à la fois de comparer nos résultats avec ceux des études plus invasives, par exemple à l'échelle cellulaire, chez le PNH, et avec celles non invasives réalisées chez l'homme en IRMf. Le macaque Rhésus est une espèce très utilisée en Neurosciences, notamment parce que ces animaux possèdent des systèmes perceptifs visuel et auditif globalement similaires à ceux de l'homme tant sur le plan structural que fonctionnel.

Notre projet satisfait aux exigences de raffinement et de réduction de l'expérimentation animale notamment grâce aux points suivants :

Utilisation d'une technique non invasive (IRM)

Utilisation d'un modèle animal (macaque Rhésus) indispensable du fait de sa proximité avec l'homme malgré des différences comportementales/ Intérêt majeur pour l'étude de l'origine du langage/ Littérature importante concernant l'anatomie cérébrale du macaque permettant une comparaison plus aisée avec l'homme.

Réalisation d'un protocole d'entraînement adapté afin de minimiser le stress de l'animal.

Entraînement par renforcement positif

Exposition limitée aux produits anesthésiants car pratique de l'IRMf chez l'animal éveillé (et sans aucun traitement douloureux). Par ailleurs, si l'entraînement n'aboutit pas, une anesthésie minimale sera envisagée afin d'éviter un entraînement abusif, stressant pour l'animal et inutile pour notre étude.

Réduction du nombre d'individus utilisés au minimum nécessaire pour publier les travaux et réaliser des tests statistiques.

Utilisation d'animaux ayant déjà participé à des expérimentations dans d'autres équipes de recherche.

Exploitation maximale du temps expérimental (dans le scanner) en réalisant plusieurs techniques de traitement (imagerie anatomique, fonctionnelle et de diffusion)

La règle de remplacement ne s'applique pas dans notre cas puisque l'intérêt est justement d'étudier le modèle animal le plus proche de l'homme. De plus, des modèles mammifères moins « évolués » ne seraient pas adéquats, par manque crucial de littérature sur ce sujet d'une part, et par des incompatibilités techniques d'autre part.

3200. L'arthrose entraîne la dégradation du cartilage, provoquant des douleurs et une mobilité réduite. Le cartilage ne possède aucune propriété de réparation. A l'heure actuelle la mise en place de prothèse reste la seule solution ; dans ces conditions on comprend l'intérêt d'une étude permettant la régénération du cartilage articulaire.

Nous proposons d'étudier l'effet de la surexpression d'une protéine (Lin28) qui pourrait reprogrammer les cellules et donner au cartilage la capacité de se réparer. Dans la littérature il est montré que Lin28, normalement présente au stade embryonnaire, pouvait augmenter la capacité de réparation de différents tissus.

Les modèles cellulaires sont incomplets pour ce qui est d'étudier la régénération. A ce jour, seules les données obtenues in vivo permettront d'intégrer l'ensemble des paramètres de la maladie. Nous voulons cibler uniquement le cartilage articulaire durant l'arthrose, nous utiliserons donc des souris génétiquement modifiées, où il est possible d'induire l'expression de la protéine Lin28 dans le cartilage uniquement, par injection du Tamoxifène.

En provoquant une instabilité articulaire chez la souris, on reproduit l'arthrose en affectant l'ensemble des tissus. Cette instabilité articulaire consiste à pratiquer une méniscectomie (ablation chirurgicale d'un ménisque). Pour cette étude nous voulons utiliser deux approches. La première consiste à induire la sur expression de lin28 avant la méniscectomie, ce qui permettra de valider son rôle protecteur. Pour ce premier groupe l'injection du tamoxifène se fera une semaine avant la méniscectomie sur 20 souris sauvages et 20 souris modifiées génétiquement. La seconde approche consiste à induire cette sur expression durant le développement de l'arthrose, ce qui permettra de valider le rôle curatif de lin28. Pour ce deuxième groupe l'injection du tamoxifène se fera 4 semaines après la méniscectomie (20 souris sauvage et 20 souris modifiées génétiquement). Dans les deux expérimentations les souris seront sacrifiées 8 semaines après la méniscectomie. L'ensemble du projet concernera 80 souris sur une période maximale de 4 ans.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux sans compromettre les résultats, nous pratiquerons la méniscectomie sur un seul des genoux de la souris, l'autre servant de contrôle. L'animal sera ainsi son propre témoin.

Chaque souris, recevra deux injections de Buprenorphine, (molécule opiacée) permettant le traitement de la douleur, la première sera faite 15 mn avant chaque intervention chirurgicale, la seconde six heures plus tard. L'acte chirurgical sera pratiqué sous anesthésie générale, par injection intra péritonéal, (Kétamine et de Xylazine). Durant l'hébergement de 8 semaines les souris seront 6 par cage, enrichie de matérielle pour la nidification. Les souris seront observées 3 fois par semaine pour rechercher tous signes de souffrance, tel que : modification du comportement, poils hérissés et ternes, hypoactivité, prostration, vocalismes et boitement. Si un de ces signes était observé l'animal en question fera l'objet de dispositions particulières (mesure du poids, injection d'antalgique par voie sous cutané, mise en place de nourritures plus accessible sous forme de gelée enrichie). Si ces signes persistent et/ou que l'animal perd 20% de son poids malgré les traitements antalgique l'animal sera alors retiré de l'expérimentation et mis à mort.