

ÉDITO par Jean-Pierre CLOT - Secrétaire général OPAL

En 2003, l'OPAL organisait un colloque sur le 1^{er} des 3R de Russell et Burch : le Remplacement, sous la présidence de notre regrettée Chantal Autissier. Depuis cette date, la recherche a permis d'améliorer de nombreuses méthodes et en a fait émerger de nouvelles. Il était donc d'actualité de faire un état des lieux des méthodes alternatives disponibles et de celles en cours de développement afin de donner des pistes aux professionnels de l'expérimentation animale pour respecter l'obligation d'utiliser des méthodes n'utilisant pas l'animal de laboratoire dans la mesure où elles fournissent des réponses fiables et équivalentes aux expérimentations *in vivo*. Pour concrétiser ce projet, l'OPAL s'est associée à FRANCOPA, la Plateforme française pour le développement de méthodes alternatives en expérimentation animale, dédiée au développement, à la validation et à la diffusion de ces méthodes.

La mise en pratique du remplacement implique que les membres des Comités d'Éthique en Expérimentation Animale (CEEA) maintiennent à jour leurs connaissances sur toutes les méthodes de remplacement possibles ou validées, au moins dans le périmètre scientifique d'action du ou des établissements rattachés à leur comité. Il est donc essentiel que les concepteurs de projet et les membres des CEEA fassent un effort particulier et spécifique pour se documenter sur le remplacement via l'ECVAM, FRANCOPA et notre association, l'OPAL. De même, la question se pose de remettre à plat toutes les méthodes utilisées pour déterminer la sécurité des médicaments, dans le contexte de la réglementation et des bonnes pratiques de laboratoires. L'OPAL ne peut que s'associer à toutes les personnes qui demandent avec insistance la mise en œuvre de financements ciblés spécifiques pour aider les scientifiques qui développent des méthodes de remplacement dans ce cadre. L'effort sera long, mais le jeu en vaut largement la chandelle.

La formation continue de tous les acteurs et particulièrement des membres de comités d'éthique sur le remplacement, la réduction (mathématiques appliqués, statistiques) et le raffinement (méthodes plus modernes, simples, raffinées) est primordiale, car elle est le gage de la réussite de la mise en œuvre concrète et efficace de la règle des 3R dans le nouveau paysage scientifique et réglementaire.

C'est ainsi que le 4 novembre 2015 à l'ASIEM à Paris, l'OPAL et FRANCOPA ont organisé un colloque sur le thème : « Place des méthodes de remplacement en expérimentation biologique ». La présidente d'honneur de cette manifestation a été Mme Monique Adolphe qui présida naguère aux destinées de l'OPAL et dont le rôle éminent dans le développement de méthodes alternatives est unanimement

reconnu. Nous avons eu le grand plaisir d'accueillir plus de 200 participants pour cette manifestation qui a reçu le parrainage du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche.

Après une courte présentation de FRANCOPA par sa présidente, Francelyne Marano, huit orateurs se sont succédés à la tribune :

Anne Gourmelon (OCDE) a rappelé le rôle de l'OCDE dans le développement d'alternatives à l'expérimentation animale dans ses lignes directrices. Elle a présenté les méthodes et combinaisons de méthodes informatiques et *in vitro*.

Anne-Lise Bennaceur-Griscelli (Inserm U935) nous a décrit les fascinantes perspectives liées à la reprogrammation de cellules somatiques humaines en cellules souches pluripotentes induites qui permettent notamment de modéliser les pathologies humaines pouvant ainsi se substituer à certains modèles animaux (organes *ex vivo*).

Fabien Guillemot a présenté Poietis, première société au niveau international à exploiter la technologie de bioimpression 3D assistée par laser, qui propose des solutions de tissus personnalisés et notamment des peaux reconstruites pour évaluer des actifs en cosmétologie.

Robert Barouki (Inserm U1124), à propos des « omics », a choisi de nous parler de l'exposome, terme qui regroupe sur la durée entière de vie d'un organisme, tous les facteurs de risque pour la santé qui ne sont pas d'origine génétique.

Céline Brochot (Ineris) a parlé des approches de modélisation pour extrapoler *in vivo* les effets observés

in vitro grâce à l'utilisation de modèles toxicocinétiques à fondement physiologique.

Hervé Tricoire (UMR8251 Paris Diderot) a illustré à l'aide d'exemples l'intérêt des modèles drosophiles dans l'étude de pathologies neurodégénératives et cardiaques comme étape préalable à très large spectre avant l'exploration chez les mammifères, pour les mécanismes très conservés dans l'évolution.

Catherine Vogt (WASP science) nous a fait part de son expérience en tant que responsable de formations, notamment à la chirurgie, dans le développement de méthodes recourant systématiquement à la substitution à des fins d'enseignement.

Joseph-Paul Beaufays (Université de Namur, Président du groupe de réflexion sur les méthodes alternatives en Wallonie) a enfin traité un thème éthiquement très important qui est celui des alternatives à l'ascite pour la production d'anticorps monoclonaux en soulignant leurs limites dans le cadre de la recherche fondamentale.



Le programme a été complété par 14 communications affichées dont deux ont été sélectionnées pour une courte présentation orale et Laetitia Jaillardon a pu également présenter son travail récompensé par le Prix OPAL 2014.

Au cours de cette journée, nous avons accueilli Monsieur Carlo Di Antonio, Ministre de l'environnement, de l'aménagement du territoire, de la mobilité et des transports et du bien-être animal de Wallonie, accompagné d'experts de son Cabinet en vue de la préparation du Colloque Walcopa du 22 Novembre 2016 à Namur ce qui laisse entrevoir une collaboration francophone étroite dans le domaine des méthodes alternatives à l'expérimentation animale.

Les quatre articles qui suivent permettent d'approfondir quatre thématiques traitées lors du colloque.

LES ALTERNATIVES À L'ASCITE POUR LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Joseph-Paul BEAUFAYS

Université de Namur

Au cours des années 1970, l'on découvre que des myélomes produisent de grandes quantités d'anticorps identiques. En 1975, Köhler et Milstein publient dans la revue Nature une technique révolutionnaire pour la production d'anticorps monoclonaux, basée sur la méthode de l'ascite chez le rongeur. Ils recevront en 1984 le Prix Nobel de Médecine et de Physiologie pour leurs travaux.

La production des anticorps, selon les ascites, se déroule en deux étapes. La 1^{ère} consiste à créer et à sélectionner des hybridomes. Au cours de cette étape, l'immunisation d'un rongeur contre un antigène bien défini est préalable à la fusion des cellules spléniques avec des cellules tumorales. L'hybridome ainsi créé conserve les propriétés des deux types cellulaires dont il est issu : la capacité à synthétiser des anticorps et à se diviser à l'infini. Au cours de la 2^{ème} étape, les hybridomes sont injectés dans le péritoine de la souris. Ils y prolifèrent en entraînant un gonflement abdominal, suite à la réaction tumorale, puis sont récoltés par ponction du liquide ascitique.

Cette seconde étape entraîne globalement une grande souffrance chez les rongeurs et nécessite la mise en place d'un système de surveillance des animaux, pendant la 1^{ère} semaine après l'injection intrapéritonéale des hybridomes, ainsi que la mise en œuvre de points limites, révélateurs de la souffrance animale : réduction de l'activité, apparence voûtée, détresse respiratoire, perte de poids...

Plusieurs pays européens ont dès lors interdit ou limité drastiquement la méthode de l'ascite : l'Allemagne, l'Autriche, les Pays-Bas, le Royaume-Uni... La situation dans 2 pays de la Francophonie mérite également une analyse approfondie du point de vue de l'éthique de la bio-production. Au Canada, le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) a rédigé dès 2002 les « Lignes directrices du CCPA : production d'anticorps », à l'intention des Comités canadiens d'éthique en expérimentation animale, dans le but de favoriser les méthodes de remplacement, *in vitro*. En Belgique, l'Arrêté

Royal du 25 avril 2014 interdit « certaines expériences sur animaux en ce qui concerne la production d'anticorps monoclonaux par la méthode de l'ascite ».

Les mesures prises dans tous ces pays s'inscrivent dans l'esprit des recommandations de l'ECVAM. En effet, dès 1997, le Centre européen organisait un Workshop, consacré à la production d'anticorps monoclonaux, en encourageant déjà le recours aux méthodes de production alternatives. La multiplication des hybridomes, réalisée initialement *in vivo*, était désormais devenue possible dans de multiples systèmes *in vitro*, offrant un large spectre de techniques et une efficacité permettant le remplacement de la méthode de l'ascite dans plus de 90 % des cas (ILAR 1999).

Cependant, lorsqu'un anticorps monoclonal n'est pas disponible commercialement, le chercheur est confronté à un premier défi : faire proliférer les hybridomes *in vitro*, pour produire cet anticorps.

La quantité d'anticorps monoclonaux à obtenir conditionne le système de production *in vitro* à utiliser. Dans le but d'aider l'expérimentateur, l'ECVAM propose une sélection de techniques, adaptée aux besoins des utilisateurs, subdivisée en 3 catégories de systèmes de production et de rendements : les cultures d'hybridomes en suspension, statiques ou soumises à l'agitation mécanique, comme les « Flasks », ou les bouteilles du type « Cell Roll », permettant d'obtenir des concentrations d'anticorps jusqu'à 50 µg/ml ; les technologies basées sur les membranes semi-perméables pour des taux allant jusqu'à 0,2 mg/ml ; et les bioréacteurs à haute densité en cellules pour des titres jusqu'à 1mg/ml d'anticorps monoclonaux.

La qualité des anticorps monoclonaux, leur nature et leur degré « d'humanisation » conditionnent également les techniques de production *in vitro*. En passant progressivement des anticorps à 100 % murins, aux anticorps chimériques, (environ 50 % humains), puis aux anticorps humanisés à 90 %, et enfin aux anticorps intégralement humains, à 100 %, l'on étendra les techniques classiques de production *in vitro* aux technologies du « phages display », ou encore aux souris transgéniques.

Les difficultés expérimentales rencontrées en bio-production sur le terrain et les défis scientifiques et technologiques, tant au plan quantitatif que qualitatif, qui se posent régulièrement aux chercheurs, restent donc loin d'être négligeables. Mais le débat se nourrit également des enjeux économiques, géopolitiques et éthiques relatifs à la production des anticorps monoclonaux.

Les enjeux économiques et en particulier le coût de production des anticorps constituent un autre paramètre important pour le chercheur. Selon que la production concerne la recherche fondamentale, les essais cliniques ou la production industrielle, les techniques de production *in vitro* et leur coût financier vont varier selon les spécificités de la situation.

L'ECVAM répartit les utilisateurs en 4 catégories, en fonction de la quantité totale d'anticorps dont ils ont besoin. (Source : Monoclonal Antibody Production - ECVAM Workshop 23). Une large majorité, soit quelque 60 % des utilisateurs, principalement les chercheurs académiques, souhaite

disposer d'au maximum 100 mg d'anticorps. Quelque 30 % ont besoin d'une quantité comprise entre 0,1 g et 0,5 g d'anticorps monoclonaux. Environ 10 % utilisent de 0,5 g à 10 g. Seule une infime minorité, environ 1 %, utilise plus de 10 g. Les utilisateurs de très petites quantités d'anticorps, proportionnellement les plus chers à produire, seront généralement les plus pénalisés.

Les enjeux géopolitiques ne sont pas non plus étrangers au débat concernant la Recherche en général et la production d'anticorps monoclonaux en particulier. Des législations plus contraignantes sont susceptibles d'entraîner des risques de délocalisation des entreprises. Aujourd'hui, les USA constituent le 1^{er} pays de production des anticorps monoclonaux, suivi par les pays de l'Union européenne, en compétition serrée avec les pays émergents, Chine et Inde en tête (source : LEEM).

Les enjeux éthiques restent importants à analyser lorsqu'on a recours à la méthode de l'ascite. Dans la 1^{ère} étape de cette technique de bio-production, lors de l'immunisation, la nature des adjuvants, le site et le volume d'injection seront choisis judicieusement. Durant la 2^{ème} étape de la production ascitique, l'injection intrapéritonéale de l'amorce (le pristane, l'adjuvant complet de Freund, (ACF), ou l'adjuvant incomplet (AIF)), l'inoculation par injection des hybridomes, la croissance tumorale et le volume de prélèvement du liquide ascitique seront optimisés pour réduire la souffrance animale.

L'application concrète du principe des « 3R's » de Russell et Burch, à la production d'anticorps monoclonaux se doit donc de prendre en compte les progrès des biotechnologies et la dimension éthique de la question, sans cependant occulter la complexité expérimentale de la bio-production, ni les difficultés réelles auxquelles sont confrontés les chercheurs dans leur pratique quotidienne.

La production des anticorps monoclonaux *in vitro* est sans conteste un magnifique exemple permettant d'illustrer et de discuter la place des méthodes de remplacement en expérimentation biologique.

REPLACEMENT : LA PLACE DES MÉTHODES *IN SILICO*

Céline BROCHOT, Enrico MOMBELLI

Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Direction des Risques Chroniques, Unité Modèles pour l'Ecotoxicologie et La Toxicologie (METO), Verneuil en Halatte. Contact : Celine.brochot@ineris.fr

Les méthodes *in silico* (à savoir la modélisation mathématique) contribuent au développement d'approches alternatives à l'expérimentation animale pour prédire la toxicité de produits chimiques, thérapeutiques ou cosmétiques. De nombreux travaux tant au niveau européen (par exemple, les projets CALEIDOS, PREDICT-IV et COSMOS financés par la commission européenne dans le cadre du programme FP7) qu'américain (la vision de l'Académie Nationale des Sciences pour la Toxicologie du 21^{ème} siècle, par exemple) ont mis en évidence le besoin d'approches de modélisation, soit pour analyser de manière intégrative les nombreuses données *in vivo* ou *in vitro* déjà existantes, ou pour interpréter les expérimentations *in vitro* en vue d'une extrapolation à des situations *in vivo*.

Diverses méthodes *in silico* ont été développées dans ce contexte et deux de ces méthodes ont été présentées lors du colloque : la modélisation structure-activité pour lier la structure d'une molécule à son activité biologique, et l'extrapolation quantitative de résultats observés *in vitro* à des situations *in vivo*.

LA MODÉLISATION STRUCTURE-ACTIVITÉ

La modélisation structure-activité fait l'hypothèse que des molécules présentant des structures chimiques similaires ont des activités biologiques similaires. Plusieurs méthodes, avec différents niveaux de complexité ou de formalisme mathématique, sont utilisées pour définir la similarité chimique. Elles vont de la lecture croisée (« read across ») à la modélisation quantitative QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) qui nécessite des connaissances spécifiques en modélisation moléculaire et en statistique. Ces méthodes sont citées explicitement dans l'article 13 du règlement REACH et figurent parmi les approches alternatives les plus couramment employées pour remplacer des données manquantes en vue de l'enregistrement de substances au titre de REACH. Une analyse rétrospective des dossiers soumis à l'échéance du 30 Novembre 2010 a été menée par l'ECHA et a montré que la lecture croisée représente un peu plus de 20 % des méthodes alternatives utilisées pour plusieurs tests de (éco)toxicité alors que la modélisation QSAR n'atteint pas les 5 % (Tableau 1). Afin de comprendre la faible utilisation des modèles QSAR, le consortium du projet CALEIDOS (<http://www.caleidos-life.eu/>) a évalué le pouvoir prédictif de modèles QSAR pertinents pour l'enregistrement de substances au titre de REACH et a mené des enquêtes auprès d'un panel d'experts pour comprendre leurs réticences à les utiliser.

Compte tenu du fait que l'application d'outils QSAR pour la prédiction d'effets génotoxiques est explicitement citée au premier paragraphe de l'Annexe III du règlement REACH (CE, 2006), nous avons évalué la capacité d'outils QSAR à prédire le potentiel mutagène des substances soumises à la première échéance de REACH. Le potentiel mutagène d'une substance peut s'évaluer par le test d'Ames (Ames et al., 1975) qui est une méthode *in vitro* largement utilisée en raison de son rapport fiabilité/coût particulièrement élevé. Le test d'Ames est aussi recommandé par les guides techniques du règlement REACH. Quatre modèles QSAR ont donc été appliqués pour chacune des substances en tenant compte du domaine d'application des différents modèles, et leurs prédictions ont été comparées à des données expérimentales issues du test d'Ames. La sensibilité, spécificité et concordance¹ de chaque modèle ont ainsi pu être calculées. Nos résultats montrent une très bonne fiabilité de trois de ces modèles (CAESAR, SARPY, et TTVEGA), la fiabilité plus faible du quatrième modèle (T.E.S.T.) pouvant en partie s'expliquer par un large domaine d'application couvrant des classes chimiques dont la toxicité n'est pas prédite avec fiabilité. En complément, une nouvelle approche de modélisation par consensus basée sur l'intégration des trois modèles les plus performants a aussi

¹ La sensibilité, spécificité et concordance d'un modèle indiquent respectivement sa capacité de :

- détecter les substances toxiques,
- détecter les substances inoffensives,
- détecter les deux classes.

été développée. Ce méta-modèle possède une performance prédictive supérieure à celle des modèles individuels (Figure 1).

Les enquêtes réalisées auprès d'un panel d'experts ont montré que :

- Les experts préfèrent utiliser des modèles QSAR basés sur des descripteurs mécanistiques (par exemple, lié au mode d'action des substances) plutôt que des modèles uniquement développés sur des considérations statistiques, et ce même si ces derniers possèdent une meilleure prédictibilité ;
- L'application des modèles QSAR serait facilitée si le niveau de prédictibilité du modèle était clairement spécifié. Ce niveau de prédictibilité est étroitement lié à la variabilité expérimentale présente dans chaque test biologique et doit donc être analysé en conséquence ;
- Les différentes parties prenantes demandent l'implémentation d'un cadre d'utilisation des modèles QSAR à définir en interagissant avec les modélisateurs.

Tableau 1 : Utilisation des méthodes de lecture croisée (RA) et QSAR pour différents tests d'(éco)toxicité pour l'enregistrement de substances lors de la première échéance de REACH

Effet	% RA	% QSAR
Toxicité aiguë	21.4	0.1
Sensibilisation cutanée	20.8	0.5
Toxicité par dose répétée	28.1	0.1
Génotoxicité (<i>in vitro</i>)	22	0
Toxicité du développement	29.7	0.2
Cancérogenèse	27.9	0.2
Bioaccumulation (poisson)	24.7	3.1
Toxicité aiguë (poisson)	20.2	2.1
Toxicité chronique (poisson)	21.2	4.3

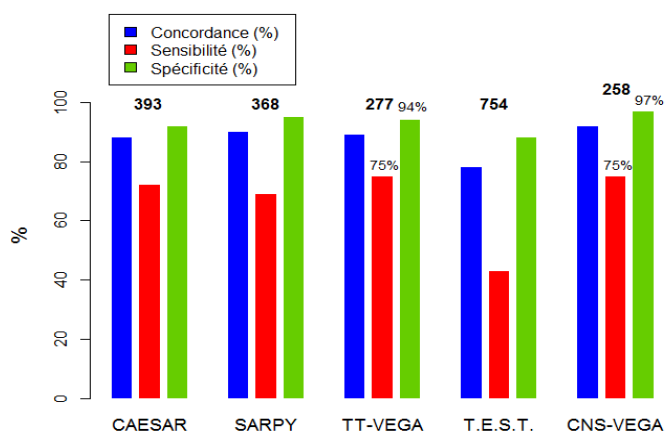


Figure 1 : Comparaison des performances prédictives de quatre modèles QSAR et du méta-modèle basé sur un consensus (CNS-VEGA) pour la prédiction du potentiel mutagène des substances chimiques enregistrées lors de la première échéance de REACH. Les nombres indiqués au-dessus des résultats par modèle représentent le nombre de substances testées incluses dans leur domaine d'application

L'EXTRAPOLATION QUANTITATIVE *IN VITRO/IN VIVO*

Les méthodologies d'extrapolation quantitative *in vitro/in vivo* ont connu un fort essor ces dernières années et tendent à se formaliser en vue de leur utilisation dans un contexte réglementaire. On peut par exemple citer l'initiative des voies d'effet néfastes (AOP pour Adverse Outcome Pathway) par l'OCDE. Le remplacement des animaux par les systèmes *in vitro* pour l'évaluation de la toxicité à moyen ou long terme des produits chimiques exige l'intégration de modèles pharmacocinétiques afin de décrire l'absorption, la distribution, le métabolisme et les processus d'excrétion qui ne sont pas reproduits *in vitro* (Adler et al., 2011). Il s'agit alors de développer des approches de modélisation pour extrapoler *in vivo* les effets observés *in vitro* grâce à l'utilisation de modèles de cinétique décrivant le comportement des substances dans les systèmes *in vitro* afin d'estimer l'exposition réelle des cellules, et de modèles d'effets *in vitro* permettant de relier l'exposition cellulaire à l'effet mesuré, puis de modèles pharmacocinétiques à fondement physiologique (appelés PBPK pour Physiologically Based Pharmacokinetic) pour simuler le devenir de substances dans des organismes vivants. La prédiction de l'effet *in vivo* est ensuite obtenue en couplant le modèle PBPK au modèle d'effet (Figure 2).

Cette approche a été illustrée avec la prédiction de la néphrotoxicité *in vivo* de la cyclosporine A (CsA) (Hamon et al., 2014). La CsA est un agent immunosuppresseur utilisé notamment dans les traitements médicamenteux après une greffe ou transplantation d'organes. Il a été montré que la CsA induit un stress oxydant qui active la voie Nrf2 dans les cellules rénales. Une approche couplant des expérimentations *in vitro* sur des cellules rénales humaines et des modèles permettant l'extrapolation des résultats à l'*in vivo* a été mise en place. Les expérimentations *in vitro* ont permis de calibrer un modèle de cinétique *in vitro* décrivant les échanges entre le milieu de culture, les cellules, et les parois du puits de culture. Ainsi les processus de liaison non-spécifique aux matériaux, d'accumulation intracellulaire, et de métabolisme ont pu être pris en compte pour estimer l'exposition réelle des cellules. Cette étape s'est avérée essentielle pour la CsA puisque il a été observé une accumulation intra-cellulaire de la CsA non-linéaire en fonction de la dose d'exposition des cellules. Des données de type Omique (transcriptomique, métabolomique et protéomique) ont été générées à partir de ces mêmes expérimentations et ont permis de calibrer un modèle systémique de la voie de signalisation Nrf2 liant l'exposition des cellules à la CsA à l'induction de stress oxydant, par la formation d'espèces réactives à l'oxygène. La dernière étape a consisté à intégrer ces modèles développés au niveau cellulaire à un modèle PBPK décrivant la pharmacocinétique de la CsA dans l'organisme humain. Ensuite ces modèles ont été utilisés pour prédire les concentrations administrées en CsA qui pourraient conduire à l'apparition d'une néphrotoxicité chez une population simulée d'individus sains. Plusieurs enseignements pour l'extrapolation quantitative *in vitro/in vivo* peuvent être tirés de ces travaux :

- La cinétique *in vitro* doit être correctement caractérisée afin de tenir compte des processus non-spécifiques et non présents dans l'organisme pour estimer une exposition cellulaire réelle ;

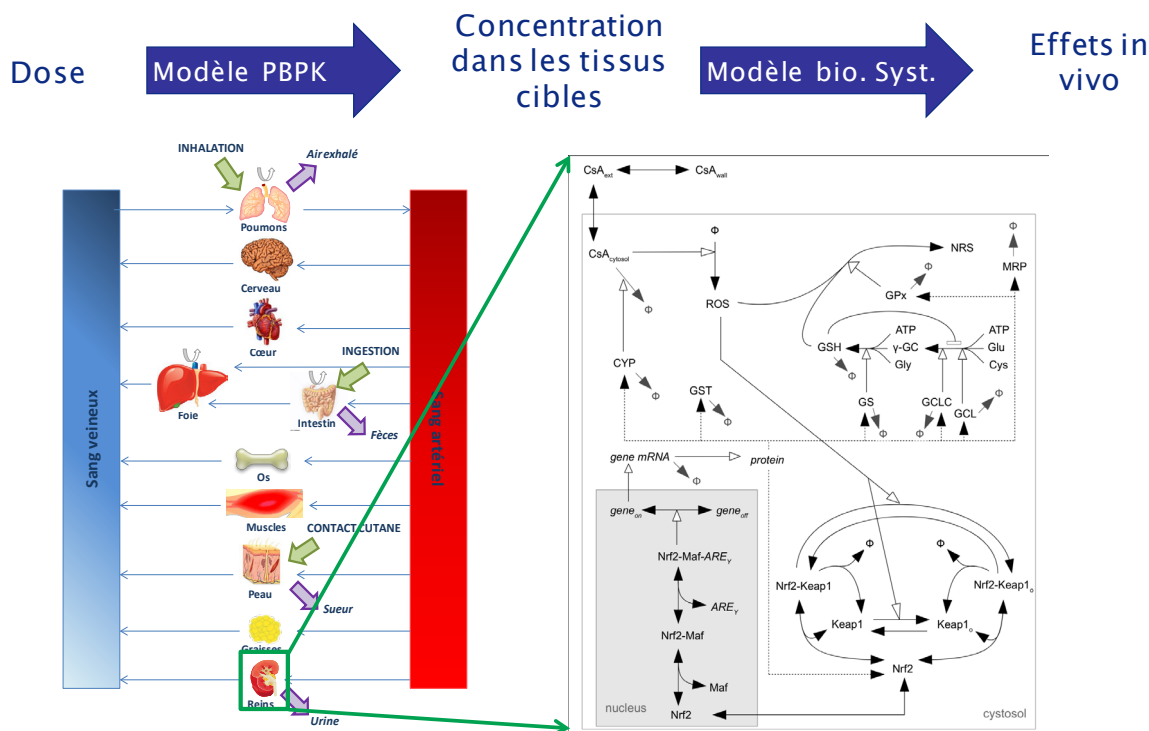


Figure 2 : Couplage d'un modèle PBPK et d'un modèle d'effet cellulaire (ici, activation de la voie de signalisation Nrf2) pour la prédiction d'un effet *in vivo*

- La modélisation mécanistique, telle que la biologie systémique, est un outil adéquat pour analyser ensemble les multiples données de type Omique qui peuvent être générées à partir d'une même expérimentation afin de comprendre et décrire les différents processus mis en jeu dans la survenue d'un effet ;
- L'extrapolation quantitative *in vitro/in vivo*, telle que présentée ici, permet de fournir des estimations quantitatives de toxicité pour divers scénarios d'exposition *in vivo*.

CONCLUSIONS

Deux approches de modélisation alternatives à l'expérimentation animale ont été exposées dans cette présentation, ainsi que leur application dans un cadre d'évaluation des risques. Un des constats est que le transfert de ces méthodes doit être mieux accompagné auprès des agences réglementaires, évaluateurs de risque et toxicologues afin d'améliorer leur acceptabilité. Par ailleurs, les méthodes *in silico* pourraient jouer un rôle prépondérant dans les orientations récentes prise par la toxicologie au niveau international, à savoir la caractérisation mécanistique des voies de toxicité conduisant à des effets néfastes.

RÉFÉRENCES

Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, van Benthem J, Zuang V, Andersen KE, Angers-Loustau A, Aptula A, Bal-Price A, Benfenati E, Bernauer U, Bessems J, Bois FY, Boobis A, Brandon E, Bremer S, Broschard T, Casati S, Coecke S, Corvi R, Cronin M, Daston G, Dekant W, Felter S, Grignard E, Gundert-Remy U, Heinonen T, Kimber I, Kleinjans J, Komulainen H, Kreiling R, Kreysa J, Leite SB, Loizou G, Maxwell J, Mazzatorta P, Munn S, Pfuhler S, Phrakonkham P, Piersma A, Poth A, Prieto P, Repetto G, Rogiers V, Schoeters G, Schwarz M, Serafimova R, Tahti H, Testai E, van Delft J, van Loveren H, Vinken M, Worth A, Zaldivar J-M (2011) Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85 (5):367-485.

Ames BN, McCann J, Yamasaki E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Research 31:347-364.

Cassano A, Raitano G, Mombelli E, Fernandez A, Cester J, Roncaglioni A, Benfenati E (2014) Evaluation of QSAR Models for the Prediction of Ames Genotoxicity: A Retrospective Exercise on the Chemical Substances Registered Under the EU REACH Regulation. Journal of Environmental Science and Health Part C-Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews 32 (3):273-298.

CE (2006). Annexe III du règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission.

Hamon J, Jennings P, Bois FY (2014) Systems biology modeling of omics data: effect of cyclosporine a on the Nrf2 pathway in human renal cells. BMC Systems Biology 8:76.

APPROCHES GÉNÉTIQUES ET PHARMACOLOGIQUES CHEZ LA DROSOPHILE POUR L'ÉTUDE DE PATHOLOGIES HUMAINES

Hervé TRICOIRE

Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, UMR8251, Université Paris Diderot/CNRS

Les modèles animaux sont indispensables pour identifier les mécanismes physiologiques et développer de nouvelles thérapies pour des maladies humaines. En effet, même si des études cellulaires peuvent apporter des données très importantes sur les pathologies, elles sont en général insuffisantes pour appréhender la complexité des événements se déroulant dans un organisme multicellulaire (interactions cellulaires, signalisation à longue distance, régulations métaboliques, ...). Les modèles rongeurs (souris ou rats) sont toujours de loin les plus utilisés dans les études pré-cliniques. Cependant, malgré des coûts très importants pour les laboratoires et les compagnies pharmaceutiques, 80 % des traitements basés sur ces études, échouent sur les patients (S. Perrin, Nature 507 (2014) 423). Parmi les causes d'échec on peut citer des modélisations incomplètes de la maladie, une insuffisante prise en compte de l'effet du fond génétique et des statistiques insuffisantes. Ainsi il est critique de définir de nouvelles stratégies pour 1) améliorer les probabilités de succès dans les études cliniques 2) limiter le nombre d'animaux sacrifiés dans des études infructueuses.

Les modèles Drosophile, qui ont émergés au début du 21^{ème} siècle après la prise de conscience que 75 % des gènes impliqués dans des pathologies humaines sont conservés chez la Drosophile, peuvent représenter un outil de choix pour ces nouvelles approches. En effet, des outils de génétique moléculaire sophistiqués permettent de contrôler *in vivo* l'expression d'un gène d'intérêt à 3 niveaux (spatial, temporel, intensité), d'étudier les phénotypes résultant et de chercher des modificateurs génétiques ou pharmacologiques des pathologies induites. Ces études, bénéficiant du temps de vie court de la Drosophile, de fond génétique bien contrôlés, de bonnes statistiques (plusieurs centaines d'animaux par expérience) et de coûts réduits par rapport aux études sur mammifères permettent d'identifier des mécanismes potentiels de toxicité ou des composés actifs sur la pathologie, pour les valider ensuite dans un second temps sur des modèles rongeurs.

Les domaines d'études auxquels peut s'adapter cette stratégie sont variés. Comme exemples représentatifs présentés dans le colloque OPAL-FRANCOIPA 2015 on citera :

- la validation de nouveaux gènes de susceptibilité dans la maladie d'Alzheimer (Schulman et al. HMG (2014) 23, 870, Chapuis et al. Molecular Psychiatry (2013) 18, 1225-1234);
- une meilleure compréhension des voies de transduction impliquées dans les cancers de la thyroïde et l'identification de nouvelles drogues anticancéreuses (Das & Cagan Drug Discovery Today 10 (2013) e65);
- la modélisation des hypertrophies cardiaques intervenant dans l'ataxie de Freidreich et l'identification de composés restaurant le fonctionnement cardiaque (Tricoire et al. HMG 23 (2014), 968).

Tout en ayant conscience des limites des modèles Drosophiles (comme tout modèle), les succès obtenus récemment dans un vaste spectre de pathologies humaines plaident pour un renforcement des interfaces de ces modèles avec les autres stratégies d'études de maladies humaines.

EXEMPLE DE MÉTHODE ALTERNATIVE EN ENSEIGNEMENT ET FORMATION OU L'ENSEIGNEMENT DE LA CHIRURGIE, SANS MAL ET SANS ANIMAL

Dr Catherine VOGT

DVM - DSV SMAL - Dip LAS

Après une rapide illustration des possibilités offertes pour remplacer la classique dissection de la grenouille, je recentrerai mon propos sur l'animal de laboratoire et sur l'enseignement de la chirurgie à travers d'exemples.

Si le contexte règlementaire et la mise en application de la Directive 2010-63 viennent renforcer l'intérêt grandissant de la simulation dans l'enseignement, dans le secondaire, la suppression des travaux pratiques sur le vivant a permis l'émergence d'outils originaux et ludiques (photo 1). Durant le premier cycle de l'enseignement supérieur, la réflexion sur le remplacement de l'animal avance, mais le recours aux méthodes alternatives reste aléatoire, comme le souligne l'étude faite par la CNEA⁽¹⁾.

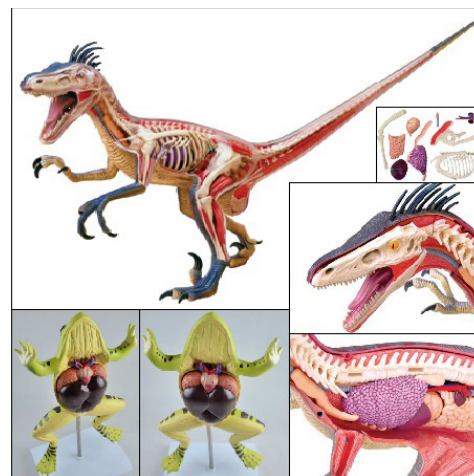


Photo 1

cf. ref A.

Dans le domaine de l'animal de laboratoire, plusieurs modèles sont disponibles et bien connus pour s'entraîner au gavage et au prélèvement sanguin (Koken rat, cf. réf B.). Il existe également des modèles chirurgicaux plus ou moins perfor-

mants, comme le PVC Rat (cf. réf C.), qui permet de pratiquer plusieurs interventions, en utilisant des pièces plastiques interchangeables. Les micro-tubes développés par KEZLEX⁽²⁾ présentent des caractéristiques de plasticité sensiblement analogues à ceux d'un vaisseau. L'exercice de suture microchirurgicale est alors quasi identique à celui réalisé sur le vivant.

Dans le cadre d'une démarche 3R au sein de l'École de Chirurgie de Lyon, la validation, puis l'intégration de supports d'entraînement microchirurgical, l'un physique - Round the clock ou double horloge décrit dès 2008 par le Pr Chan WY⁽³⁾ - l'autre biologique, ont permis le remplacement de 45 % des animaux utilisés, mais également d'améliorer la qualité de la première anastomose *in vivo*. Les problèmes d'étanchéité et de perméabilité devenus anecdotiques, les efforts consentis sur substituts sont particulièrement bien perçus et valorisés par l'apprenant. Au delà des 6 à 20

étudiants impliqués dans une session spécialisée *in vivo* sur porc, le prélèvement systématique de tissus et/ou organes frais, associé aux investissements pour leur conservation, permettent désormais de fournir le matériel nécessaire à cinq équipes de recherches et d'assurer plus de trente cours en formation initiale ou continue, pour plus de 900 étudiants et stagiaires (médecins, urgentistes, IBODES).

Si il est important de proposer un recours systématique au remplacement dans l'élaboration de nouveaux programmes, il est déterminant de tenir compte des contraintes locales et du contexte socio-économique pour le pérenniser.

Ainsi au Cambodge, une ressource végétale locale, exempte de risques sanitaires, et accessible à moindre coût, constitue *in fine* un substitut surprenant mais déterminant dans la faisabilité d'un enseignement de microchirurgie.

La « Formation en technique chirurgicale appliquée à la chirurgie expérimentale sans utilisation d'animal vivant » de WASP science associée à un remplacement total du vivant (0 animal vivant = 0 souffrance), une démarche dite « durable » de réduction des déchets, tout en restant totalement pratique. Distinguée par le Prix de Biologie Alfred Kastler 2013, décerné par la Fondation Droit Animal, Ethique & Science, cette formation s'organise autour de substituts et supports, certains connus, et d'autres, totalement originaux développés pour répondre à une problématique précise. La standardisation des exercices offre à l'étudiant la reproductibilité nécessaire à l'acquisition des gestes jusqu'à la maîtrise... sans stress.

Aujourd'hui qu'il semble difficile de formaliser un consensus entre le « tout animal », et le « sans travaux pratiques », il est indispensable d'analyser la qualité de l'acquisition technique des apprenants, sa consolidation et son impact. En tenir compte pour faire évoluer les séquences pédagogiques est déterminant, tout comme l'étude de satisfaction. Ainsi si 88 % évoluent dans leur pratique, 95 % d'entre eux, très favorables à la non-utilisation d'animaux vivants, recommanderaient cette formation.

BIBLIOGRAPHIE

1. CNEA. Audit des formations de l'enseignement supérieur comportant des études sur l'animal. 2015
2. Tatsushi Mutoh, Tatsuya Ishikawa, Hidenori Ono, Nobuyuki Yasui. A new polyvinyl alcohol hydrogel vascular model (KEZLEX) for microvascular anastomosis training. *Surg Neurol Int.* 2010; 1: 74. Published online 2010 November 23. doi: 10.4103/2152-7806.72626. PMID: PMC2997226
3. Chan WY, Mishra A, Srinivasan J, Ramakrishnan V. 360 degrees Microsurgical skills practice: a 'round-the-clock' training device. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008 Sep;61(9):1110-1. doi: 10.1016/j.bjps.2007.10.088. Epub 2008 May 20. PMID: 18495565 [PubMed - indexed for MEDLINE]

RÉFÉRENCES PRODUIT

- A. Grenouille : http://fr.aliexpress.com/store/product/Free-Shipping-The-frog-dissection-model-Toad-toad-anatomical-model-The-anatomy-of-the-animals/1913228_32426037426.html
Vélociraptor : http://fr.aliexpress.com/store/product/4DMASTER-model-dinosaur-medium-Dao-Linglong-Velociraptor-Anatomy-Model-Animal-Anatomy-Model-29-piece-of-senior/136530_1937752940.html

- B. Koken Rat : <http://www.braintreesci.com/prodinfo.asp?number=KOKEN>
- C. PVC Rat : disponible auprès d'Altecbio : <http://www.altecbio.fr> tel : +33 6 11 88 41 07 ou <http://www.braintreesci.com/prodinfo.asp?number=MD-PVC>

FRANCE / EUROPE

COMPTE-RENDU DU SYMPOSIUM 3R DANOIS

Le centre danois sur le 3R a mis à disposition une bonne partie des supports visuels (en anglais) qui ont accompagné les présentations données lors du symposium 2016 sur les 3R. Parmi les intervenants et le sujets traités :

Christine Nellemann «The Danish 3R-Center – successes so far»

Kirsten Rosenmaj Jacobsen «Is it possible to reduce group size or increase power by using mice with high responding microbiota in studies of dermatitis?»

Bjarne Winther Kristensen «Towards better brain cancer treatment with novel *in vitro* models and fewer animal experiments»

Klas Abelson «Refinement of animal models of pain: Establishment of strategies to alleviate avoidable pain in rat models for pain and inflammation»

Catrina Stirling «EPAA progress and successes in 3Rs for biologicals»

Magda Sachana «The OECD framework for Adverse Outcome Pathways Development and Application»

Jesper Lassen «The Danish 3R Survey - Knowledge, attitudes and experiences with the 3Rs among researchers involved in animal experiments in Denmark»

Joanna Edwards «CRACK IT Solutions: successes from the NC3Rs technology partnering hub»

Laura Hall «Preparing dogs for study life: improving welfare, efficiency and data output»

Elliot Lilley «The RSPCA and the 3Rs: the scientific animal welfare organisation as a catalyst for change»

Dorte Bratbo Sørensen «Pathological and immunological consequences of different blood samplings procedures in mice»

<http://3rcenter.dk/arrangementer/symposium-2016/>

ÉDITION 2017 DU PRIX 3R DÉCERNÉ PAR LE CENTRE BRITANNIQUE NC3RS

Chaque année le centre Britannique NC3Rs décerne un prix pour récompenser une contribution scientifique originelle et remarquable dans le domaine des 3R publiée lors des trois dernières années. Le prix consiste en une subvention de 28000 livres pour la recherche et un prix personnel de 2000 livres. Les travaux « hautement recommandés » par le jury reçoivent une subvention de 4000 livres et un prix personnel de 1000 livres. La date limite pour le dépôt des candidatures a été fixée au vendredi 9 décembre à 16 heures (GMT)

<https://www.nc3rs.org.uk/3rsprize>

« CAAT ACADEMY » ANNONCE SON PROGRAMME DE FORMATION POUR L'ANNÉE 2017

« CAAT Academy » a annoncé ses formations (en anglais) sur les modèles *in vitro* et *in silico* pour l'année 2017 :

- APRIL 2017 Current Applications of Organs-on-a-Chip for the Pharmaceutical Industry
- JUNE 2017 *In vitro* Skin & Eye models – Part 1
- JUNE 2017 Update on the cell systems available for hepatotoxic prediction in the AOP era
- SEPT 2017 Hands-on training in quantitative human cell and effect based *in vitro* bioanalysis
- SEPT 2017 *In vitro-in vivo* extrapolation (IVIVE) to support accurate prediction of hepatic
- OCT 2017 *In silico* tools in chemical's hazard assessments
- OCT 2017 *In vitro* Skin & Eye models – Part 2
- NOV 2017 *In vitro* lung models
- NOV 2017 Kidney toxicity testing & best practices

Pour plus de détails :

[https://gallery.mailchimp.com/18620e2ddfc674eb14b66849e/files/CAAT_PROGRAM_2017.pdf?utm_source=caat+academy+training+announcement&utm_campaign=5e2d95d721-2017_Session_Program9_14_2016&utm_medium=email&utm_term=0_bf0e576842-5e2d95d721-1359585&ct=t\(2017_Session_Program9_14_2016\)&mc_cid=5e2d95d721&mc_eid=f2fc367d52](https://gallery.mailchimp.com/18620e2ddfc674eb14b66849e/files/CAAT_PROGRAM_2017.pdf?utm_source=caat+academy+training+announcement&utm_campaign=5e2d95d721-2017_Session_Program9_14_2016&utm_medium=email&utm_term=0_bf0e576842-5e2d95d721-1359585&ct=t(2017_Session_Program9_14_2016)&mc_cid=5e2d95d721&mc_eid=f2fc367d52)

FORMATION SUR LA TOXICOLOGIE *IN VITRO*

La société européenne de toxicologie *in vitro* (ESTIV) et l'association belge de toxicologie (Bel Tox) organisent une formation sur la toxicologie *in vitro*. Cette formation aura lieu à Belvaux (Luxembourg) du 8 au 13 janvier 2017. Cette formation s'adresse aux étudiants en thèse, aux chercheurs post-doctoraux et aux experts issus de l'industrie, des agences gouvernementales ou de l'université.

<http://estivbeltox2017.webs.com/>

RÉGLEMENTATION DES MÉDICAMENTS ET PRINCIPE DES 3R

L'agence européenne des médicaments (EMA) a mis à disposition deux documents qui reflètent la volonté de prise en compte croissante du principe des 3R au sein du contexte réglementaire des médicaments.

- Draft review and update of EMA guidelines to implement best practice with regard to 3Rs (replacement, reduction and refinement) in regulatory testing of medicinal products – report on actions taken

http://www.ema.europa.eu/ema/doc_index.jsp?curl=pages/includes/document/document_detail.jsp?webContentId=WC500211433&murl=menus/document_library/document_library.jsp&mid=0b01ac058009a3dc

- Draft guidance for individual laboratories for transfer of quality control methods validated in collaborative trials with a view to implementing 3Rs

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/includes/document/document_detail.jsp?webContentId=WC500211432&mid=WC0b01ac058009a3dc

Le premier document décrit l'évolution du travail de mise à jour des lignes directrices de l'EMA depuis la publication de la feuille de route sur ce sujet en 2014. Le deuxième document (date butoir pour les commentaires : 31/01/2017) se propose, dans le cadre du contrôle qualité des médicaments humains et vétérinaires, de faciliter le transfert de nouvelles méthodes 3R validées lors d'études collaboratives parmi plusieurs laboratoires vers des nouveaux laboratoires.

NORECOPA

Le centre 3R norvégien NORECOPA a ouvert son site web (<http://norecopa.no>) qui offre un aperçu global des bases de données, des centres d'informations, des réglementations, des revues et des forums de discussion en ligne sur les 3R et le bien-être animal. Le site est composé par environ 6000 pages, films et illustrations. Le site web de NORECOPA contient un moteur de recherche dédié permettant une recherche efficace de son contenu.

Un poster sur NORECOPA peut être téléchargé à l'adresse suivante : <http://norecopa.no/website-poster>

INTERNATIONAL

50^{ÈME} ANNIVERSAIRE DE LA LOI AMÉRICAINE SUR LE BIEN-ÊTRE ANIMAL : LE BILAN ET LES PRÉCONISATIONS POUR LE FUTUR

La faculté de droit de Harvard organise une conférence (2-3 décembre 2016) à l'occasion du cinquantième anniversaire de la loi sur le bien-être animal (Animal Welfare Act) rentrée en vigueur en 1966. Cette conférence dressera le bilan de la loi et formulera des préconisations pour l'évolution des principes juridiques qui sous-tendent le bien-être animal.

<http://animal.law.harvard.edu/events/the-animal-welfare-act-at-50/>

MANIFESTATIONS

COLLOQUE ECOPA/SSCT SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES

Helsinki, 14-16 juin 2017

La plate-forme européenne « ECOPA » pour la promotion de l'application du principe des 3R (substitution, réduction et amélioration) en expérimentation animale et la Société Scandinave de Toxicologie Cellulaire (SSCT) organiseront en 2017 un colloque titré :

«Up-to-date *in vitro* approaches in regulatory risk assessment and disease modelling» (Helsinki, 14-16 juin 2017)

Parmi les sujets principaux qui seront traités lors de ce colloque : le concept de IATA (approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation) et les prédictions toxicologiques par lecture croisée (read-across).

Date butoir pour l'envoi des résumés : 31 mars 2017

Pour plus d'informations :

<http://ficam.fi/en/about-ficam/newsarchive/49-ecopa-ssct-kokous-2017>

COLLOQUE SUR L'EXPOLOGIE ET LES MÉTHODES ALTERNATIVES

Le centre Britannique NC3Rs organise à Londres un colloque sur la synergie entre expologie et méthodes alternatives : « Applying exposure science to increase the utility of non-animal data in efficacy and safety testing »

Le colloque aura lieu à Londres le 15-16 février 2017 et il sera présidé par le Pr Alan Boobis de l'Imperial College de Londres. La participation est gratuite mais l'inscription est obligatoire.

Parmi les sujets traités :

- Accroître la pertinence physiologique des essais *in vitro* et caractérisation des expositions de l'homme aux substances chimiques
- Modélisation de relations quantitatives entre exposition et réponse pour les essais *in vitro*
- Renforcer la confiance en matière de modélisation informatique des expositions
- Perspectives réglementaires

www.nc3rs.org.uk/events/workshop-applying-exposure-science-increase-utility-non-animal-data-efficacy-and-safety

EURL-ECVAM / OCDE**RAPPORT EURL ECVAM SUR L'ÉTAT DES LIEUX EN MATIÈRE DE MÉTHODES ALTERNATIVES**

L'EURL ECVAM a publié son rapport 2016 détaillant l'état des lieux en matière de développement, validation et recevabilité réglementaire des méthodes alternatives à l'expérimentation animale.

Ce rapport met en évidence les progrès qui ont été accomplis dans le domaine des méthodes alternatives et il prête une attention particulière à une utilisation conjointe de méthodes *in silico* et *in vitro*. En effet, les informations qui peuvent être collectées en fonction de ces deux approches jouent un rôle important au sein des approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation (IATA : Integrated approaches on Testing and Assessment). Ces approches intégrées permettent d'évaluer le profil toxicologique d'une substance chimique sur la base d'informations mécanistiques formalisées dans le cadre conceptuel des «chemins de l'effet néfaste» (AOP : Adverse outcome Pathways).

<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC103522/eurl%20ecvam%20status%20report%20oct%202016%20online.pdf>

DOCUMENT OCDE SUR LES BONNES PRATIQUES POUR LE DÉVELOPPEMENT DE TESTS IN VITRO

L'OCDE a mis à disposition un document sur les bonnes pratiques pour le développement et la mise en œuvre de méthodes *in vitro* destinées à être appliquées dans un contexte réglementaire : «The Draft Guidance Document on Good *In Vitro* Method Practices (Givimp) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment»

L'OCDE a fixé au 16 décembre 2016 la date butoir pour les commentaires publics

http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Draft%20GIVIMP_%2020161028.pdf

Directeur de la publication : Philippe HUBERT

Directeur de la rédaction : Enrico MOMBELLI

Maquette : Vanessa VEG

Crédit photo page 1 : Hervé LERAT

FRANCOPA est constitué des représentants des structures suivantes :

ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et de la santé
CEA	Commissariat à l'Énergie Atomique et aux énergies alternatives
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
FEBEA	Fédération des Entreprises de la Beauté
INERIS	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
LEEM	Les Entreprises du Médicament
LFDA	La Fondation Droit Animal, éthique et sciences
MENESR	Ministère de l'Éducation nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche
OPAL	Recherche Expérimentale et Protection de l'Animal de Laboratoire
SIMV	Syndicat de l'Industrie du Médicament Vétérinaire
SPTC	Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire
UIC	Union des Industries Chimiques