

En 2003, l'OPAL organisait un colloque sur le 1<sup>er</sup> des 3 R 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 est 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

#### **COMITÉ D'ORGANISATION**

Patrick Gonin (IGR), Président de l'OPAL

Francelyne Marano (Université Denis Diderot), Présidente de FRANCOPA

Jean-Pierre Clot (OPAL-Université Paris Descartes)

Philippe Delis (OPAL-Genopole)

Dominique Durand (OPAL)

Philippe Hubert (Francopa-Ineris)

Evelyne Huguet (OPAL)

Henri Maurin-Blanchet (OPAL)

Enrico Mombelli (Francopa-Ineris)

Anne Tilloy (Francopa-Anses)

Alban Vignaud (OPAL-Généthon)



RECHERCHE EXPÉRIMENTALE  
ET PROTECTION DE L'ANIMAL DE LABORATOIRE

Fondée en 1968, l'OPAL (Recherche expérimentale et protection de l'animal de laboratoire) est la plus ancienne association française de professionnels préconisant une recherche expérimentale de qualité et une utilisation raisonnée et éthique des animaux de laboratoire.

Les objectifs de l'OPAL sont de :

- contribuer au développement de méthodes substitutives valides,
- promouvoir l'éthique et les bonnes pratiques en matière d'expérimentation animale,
- proposer une réflexion de haut niveau sur l'évolution de la recherche expérimentale.

L'association rassemble des professionnels du secteur académique (Universités, Inserm, CNRS) et des industries pharmaceutiques, cosmétique, chimique, agro-alimentaire et des biotechnologies.

L'OPAL participe aux groupes de travail, instances et commissions représentatives des professionnels auprès des pouvoirs publics, décerne des prix à des journalistes pour le traitement objectif et non partisan des sujets se rapportant à l'expérimentation animale, récompense des travaux de recherche développant des méthodes substitutives, organise tous les 2 ans des colloques très appréciés de la communauté scientifique et des tutelles en particulier sur le thème de la fameuse règle des 3 R (Remplacer, Réduire, Raffiner).

[www.opal-association.org](http://www.opal-association.org)



FRANCOPA est la plateforme française dédiée au développement, à la validation et à la diffusion de méthodes alternatives en expérimentation animale. Elle a été créée en 2007 (sous la forme d'un Groupement d'Intérêt Scientifique – GIS « méthodes alternatives"). Dans un cadre d'évaluation du danger et du contrôle (produits de santé, alimentaires, cosmétiques, substances chimiques) comme dans le cadre de la recherche et de l'enseignement elle rassemble des partenaires français ayant comme objectif commun de promouvoir les méthodes permettant de réduire la souffrance animale, de recourir à des méthodes bioinformatiques, à des tests cellulaires en substitution de tests sur animaux ou pour la réduction du nombre d'animaux utilisés au cours de ces tests.

FRANCOPA est membre de la plateforme européenne ECOPA (European Consensus-Platform for Alternatives).

FRANCOPA compte quinze partenaires des différents secteurs concernés issus des quatre piliers que sont les institutions gouvernementales, les instituts de recherches, l'industrie et les organisations non gouvernementales pour le bien-être animal.

[www.francopa.fr](http://www.francopa.fr)

# Programme

- 8:30- 9:20
- **Accueil des participants**
- 9:20- 9:40
- **Introduction** par la présidente d'honneur *Monique Adolphe* et *Patrick Gonin*, président de l'OPAL
- 09:40-10:00
- **Présentation de FRANCOPA**  
*Francelyne Marano (Université Paris Diderot, présidente de FRANCOPA)*
- 10:00-10:30
- **Développement de méthodes alternatives à l'OCDE pour l'évaluation de la sécurité chimique**  
*Anne Gourmelon (OCDE)*
- 10:30-11:00
- **Les cellules souches et leurs utilisations**  
*Anne-Lise Bennaceur (Inserm U935, Université Paris Sud)*
- 11:00-11:30
- Pause-café - Posters**
- 11:30-12:00
- **Fabrication de modèles physiologiques par bioimpression**  
*Fabien Guillemot (Inserm U1026, Poietis)*
- 12:00-12:30
- **Les omics**  
*Robert Barouki (Inserm U1124, Université Paris Descartes)*
- 12:30-14:00
- Déjeuner - Posters**
- 14:00-14:30
- **Présentations des meilleurs posters**
- 14:30-15:00
- **Remplacement : la place des méthodes *in silico***  
*Céline Brochot (Ineris)*
- 15:00-15:30
- **Approches génétiques et pharmacologiques chez la Drosophile pour l'étude de pathologies humaines**  
*Hervé Tricoire (CNRS UMR8521, Université Paris Diderot)*
- 15:30-16:00
- **Exemple de méthode alternative en enseignement et formation**  
*Catherine Vogt (Université Claude Bernard Lyon 1)*
- 16:00-16:30
- **Les alternatives à l'ascite pour la production d'anticorps monoclonaux**  
*Joseph-Paul Beaufays (Université de Namur)*
- 16:30
- Discussions finales et conclusion**

**RESUMES  
DES COMMUNICATIONS ORALES**

## Développement de méthodes alternatives à l'OCDE pour l'évaluation de la sécurité chimique

Anne GOURMELON

*Administrateur principal-Programme des Lignes directrices Division Environnement, Santé, Sécurité  
Organisation de Coopération et de Développement Économiques*

Depuis plus de dix ans, le Comité des Produits Chimiques de l'OCDE consacre une part importante de ses ressources au développement, à l'acceptation réglementaire et à l'utilisation effective de méthodes alternatives aux essais sur animaux. Ces méthodologies alternatives couvrent l'ensemble des essais *in vitro*, des méthodes de *read-across* et de regroupement de produits chimiques par catégories, et l'élaboration de stratégies d'essai visant une utilisation plus judicieuse de tous ces outils.

Le Document Guide sur le regroupement des produits chimiques par catégorie initialement publié en 2007 a été révisé en 2013 pour prendre en compte l'expérience acquise et les leçons à retenir, notamment une meilleure utilisation des connaissances sur les modes d'action pour étayer la justification de la catégorie.

La publication de nombreuses méthodes *in vitro*, et leur organisation en stratégie d'essai et d'évaluation va permettre graduellement de remplacer, au moins partiellement, les méthodes *in vivo*. C'est déjà le cas pour l'irritation et la corrosion de la peau, pour lesquelles 4 Lignes directrices proposant des méthodes *in vitro* et une stratégie d'essai et d'évaluation ont été publiées. Une activité similaire est en cours pour l'irritation oculaire, la sensibilisation cutanée ainsi que pour la toxicité aiguë aquatique.

Outre le développement d'alternatives, l'OCDE est concernée par le remplacement de méthodes qui n'ont plus raison d'être, soit parce qu'elles sont redondantes, obsolètes ou éthiquement non défendables (utilisent grand nombre d'animaux), et par conséquent doivent être supprimées des Lignes directrices OCDE et des accords d'acceptation mutuelle des données entre pays.

## Les cellules souches et modélisation des pathologies humaines.

Pr Annelise BENNACEUR GRISCELLI

*Inserm U935/ ESteam Paris Sud, Infrastructure INGESTEM, Université Paris Sud*

Au cours des dix dernières années, des progrès majeurs ont été réalisés dans le domaine de la biologie des cellules souches avec en particulier la démonstration par l'équipe de Shinya Yamanaka (1,2) de la possibilité de reprogrammer une cellule adulte somatique en une cellule souche pluripotente induite ou "induced Pluripotent Stem Cell " (iPSC) par l'expression forcée des gènes Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc. Cette découverte majeure est en voie de révolutionner la recherche biomédicale dans de nombreux domaines de la médecine personnalisée et médecine régénérative, dans des conditions éthiquement acceptables. Les iPSC ont les mêmes propriétés que les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh), et quelques différences génomiques et épigénétiques ont été rapportées selon l'origine de la cellule reprogrammée et de la méthode de reprogrammation utilisée.

Contrairement aux CSEh, les iPSC permettent de modéliser les maladies humaines en reprogrammant les cellules adultes d'un individu porteur d'une pathologie génétique de manière à reproduire *in vitro* la physiopathologie de la maladie, de comprendre et établir la relation phénotypegénotype dans la cellule ou tissu d'intérêt. La production *in vitro* de lignages cellulaires par différenciation des iPSC et plus récemment la génération par méthode de culture 3D de mini-organes ou organoïdes, formant des tissus humains plus complexes à partir des iPSC (3) ou de cellules souches adultes (4,5) ouvrent des champs d'applications multiples: (i) l'identification de nouveaux biomarqueurs, (ii) l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques par correction génique, (iii) la recherche de nouveaux médicaments par des campagnes de criblage à haut débit, (iiii) la sélection de patients répondeurs et non répondeurs avant un essais clinique précoce.

Par ailleurs, la constitution d'une banque de cellules souches d'individus génétiquement différents et histoire environnementale diversifiée permettras d'améliorer les études de toxicité prédictive et de susceptibilité individuelle à une pathologie.

Le saut technologique de l'ingénierie du génome par l'utilisation du système des Cryspr/Cas9 permet de corriger ou d'induire des anomalies génétiques dans les cellules souches et de générer des tissus humains génétiquement modifiés. Compte tenu des variabilités fonctionnelles inhérentes aux modifications épigénétiques acquises au cours de la reprogrammation et de la culture *in vitro*, la production de lignées isogéniques témoins est crucial pour confirmer la relevance fonctionnelle en lien avec le génotype.

Ces technologies permettent également la modélisation de pathologies humaines multigéniques, comme les cancers. En combinant la génomique fonctionnelle et l'ingénierie cellulaire et génomique, des travaux récents ont permis de reconstruire les circuits génétiques et moléculaires du cancer colorectal humain en vue d'identifier les évènements génétiques qui contrôlent l'organisation hiérarchique et progression de la tumeur (6).

Contrairement aux lignées établies et modèles de xénogreffes, les organoïdes dérivés directement des tumeurs préservent les cellules souches cancéreuses, l'identité génomique et hétérogénéité de la tumeur primaire (7). Ils représentent ainsi des outils privilégiés pour les études de criblage moléculaire à haut débit et les approches de médecine personnalisée, en complément des modèles de greffe orthotopique chez la souris humanisée pour l'étude des métastases et l'influence du microenvironnement.

- 1- Takahashi K1, Yamanaka S . Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. Aug 25;126(4):663-76, 2006.
- 2- Takahashi K1, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. Nov 30;131(5):861-72, 2007.
- 3- Spence, J.R, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 470, 105–109, 2011.
- 4- T. Sato, R.G. Vries, H.J. Snippert, M. van deWetering, N. Barker, D.E. Stange, J.H. vanEs, A. Abo, P. Kujala, P.J. Peters, H. Clevers, Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche, *Nature* 459 262–265, 2009.
- 5- T. Sato, D.E. Stange, M. Ferrante, R.G. Vries, J.H. Van Es, S. Van den Brink, W.J. Van Houdt, A. Pronk, J. Van Gorp, P.D. Siersema, H. Clevers, Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium, *Gastroenterology* 141 1762–1772, 2011.
- 6- Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, et al. Modelling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med.*; 21:256–62, 2015.
- 7- Van de Wetering et al. Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients *Cell* May 7,161, 933– 945, 2015.

## Fabrication de modèles physiologiques par bioimpression

**Fabien GUILLEMOT**

*Poietis, Pessac.*

Les méthodes d'ingénierie tissulaire visent à développer des tissus biologiques à même de restaurer les fonctions des tissus déficients de l'organisme (médecine régénératrice), ou encore de servir de modèles physiologiques pour des études pharmacologiques ou toxicologiques (tests tissulaires *in vitro*). Historiquement, l'ingénierie tissulaire prend ses racines dans les évolutions des matériaux implantables, le concept d'implant inerte ayant peu à peu évolué vers celui d'implant biologiquement actif, capable d'interaction et d'intégration dans l'organisme hôte. Ainsi, les techniques usuelles d'ingénierie tissulaire s'appuient principalement sur la conception de biomatériaux macroporeux appelés « scaffolds » et sur leur association avec des cellules.

En dépit d'importantes recherches, l'ingénierie tissulaire demeure toujours confrontée à des défis majeurs qui limitent jusqu'à présent ses applications cliniques à des structures relativement simples, fines ou avascularisées. Ainsi, comme le souligne Scott Hollister, spécialiste de l'ingénierie du tissu osseux, « la translation clinique des techniques d'ingénierie tissulaire basées sur l'utilisation de scaffolds demeure un échec » (Tissue Eng, 2012). Plus précisément, les approches d'ingénierie tissulaire se heurtent aujourd'hui à un certain nombre d'obstacles commerciaux, réglementaires et éthiques mais aussi scientifiques tels que :

- (i) la capacité de reproduire la complexité des tissus natifs,
- (ii) les rapports coût-efficacité et coûts-avantages par rapport aux traitements existants,
- (iii) la promotion d'une vascularisation rapide lors de l'implantation (nécessaire au maintien de la viabilité cellulaire au cours de la croissance des tissus),
- (iv) la possibilité de personnaliser des produits de l'ingénierie tissulaire (c'est-à-dire d'intégrer de cellules autologues ainsi que des informations morphologiques du patient),
- (v) une sécurité absolue pour les patients, les fabricants et l'environnement,
- (vi) la conformité avec l'évolution des politiques de régulation en termes de contrôle de la qualité et de bonnes pratiques de fabrication (BPF).

En réponse à ces limites, la Bioimpression vise à produire des tissus biologiques de façon automatisée en organisant couche-par-couche les différents constituants des tissus biologiques (tels que les cellules et la matrice extracellulaire) selon des structures prédéfinies et personnalisables par conception numérique. D'un point de vue technologique, plusieurs techniques de Bioimpression ont été développées à l'échelle internationale, telles que l'impression jet d'encre ou la bioextrusion. Nos travaux menés depuis 2005 au sein de l'INSERM et l'Université de Bordeaux ont conduit à la mise au point de dispositifs et de méthodes innovants de Bioimpression par LASER (Laser-Assisted Bioprinting). Cette technologie permet d'imprimer cellule par cellule selon le mécanisme physique suivant : la focalisation d'une impulsion laser sur une cartouche (composée d'un film d'encre étalé sur une plaque de verre) entraîne la formation d'un jet d'encre vers un substrat sur lequel sont collectées des microgouttelettes de cellules. En contrôlant les conditions physiques de l'éjection (énergie, viscosité,...), le volume des gouttelettes est contrôlé précisément (~ picolitre). Ainsi, parmi les différentes technologies de bioimpression, la Bioimpression par Laser procure plusieurs avantages qui ouvre la perspective de la fabrication de tissus biologiques complexes :

- préservation de la viabilité cellulaire, le dépôt des cellules se faisant sans passage à travers un orifice ;
- rapidité d'impression, le balayage rapide de la cartouche par le laser entraînant la formation de 10 000 gouttelettes par seconde ;
- précision micrométrique et résolution cellulaire qui permettent d'imprimer des tissus avec une haute définition.

Dans ce contexte, la société Poietis, première société française de Bioimpression et première au niveau internationale à exploiter la technologie de Bioimpression par Laser, propose des solutions innovantes de fabrication de tissus personnalisés et notamment des peaux reconstruites bioimprimées pouvant servir à l'évaluation des actifs en cosmétique et pharmaceutique.



## Apport des « omiques » en toxicologie

Robert BAROUKI

*Université Paris Descartes unité Inserm 1124, 45 rue des Saints Pères 75006 Paris;  
Hôpital Necker Enfants malades, Paris.*

Comme toutes les autres disciplines, la toxicologie doit savoir s'approprier les technologies les plus récentes pour répondre à des questions toujours sans réponse. C'est ainsi que les omiques ont progressivement été intégrées dans le milieu de la recherche toxicologique. Ainsi, la génomique, la transcriptomique, la protéomique, puis plus récemment la métabolomique et l'épigénomique (et la liste, hélas un peu répétitive, n'est sans doute pas finie) sont couramment utilisées. Cet engouement n'est réellement utile que lorsqu'il est associé à une analyse mathématique des données seule capable de donner tout leur sens et leurs limites à ces approches à large spectre, dans le cadre de la biologie des systèmes.

Il est intéressant de s'interroger sur l'utilité de ces méthodes pour explorer les grandes questions en toxicologie.

- les mécanismes de toxicité : l'intérêt des omiques est leur caractère agnostique. Il n'est donc pas nécessaire de faire des hypothèses et on peut ainsi découvrir de nouveaux mécanismes insoupçonnés. Certains appellent cette approche de la pêche à la ligne, ce qui est souvent vrai, mais il y a parfois de belles prises.
- La dose : des courbes effet-dose non monotone sont observées pour plusieurs toxiques, notamment de la famille des perturbateurs endocriniens, qui sont liées soit à des mécanismes d'autorégulation soit à la multiplicité des mécanismes d'action de ces composés. Les omiques peuvent contribuer à éclairer ces questions.
- Le temps : La toxicité de certains composés peut se révéler à long terme soit parce qu'elle nécessite la répétition de l'exposition à ces molécules ou de leur persistance dans l'organisme, soit parce qu'elle passe par une modification de la programmation conduisant ainsi à des effets différés (par exemple exposition fœtale et pathologie à l'âge adulte). Pour explorer cette question, l'épigénomique permet d'identifier les marqueurs épigénétiques au moment de l'exposition et à des temps différés pour tenter d'expliquer ce phénomène de toxicité différée. Le couplage de l'épigénomique et des cellules souches peut aussi être à ce stade très utile.
- La vulnérabilité : les travaux sur les perturbateurs endocriniens ont révélé la vulnérabilité de certains stades du développement à la toxicité de ces molécules. En lien avec le point précédent, on peut proposer que le stade fœtal notamment est plus vulnérable à des modifications épigénétiques conduisant à une programmation altérée. De même la vulnérabilité génétique peut être explorée par des études de génomique.
- Les mélanges : l'environnement et l'être humain sont exposés à des milliers de molécules chimiques et nous sommes loin de comprendre les mécanismes des effets combinés ou cumulés. Clairement une approche par la biologie des systèmes peut aider à la solution de ce problème.

S'il est juste de constater que les omiques ont permis des progrès en toxicologie, il faut être conscient de leurs limites et ces méthodes restent malgré tout intrinsèquement associées à un raisonnement par hypothèse. On peut aller à la pêche, mais bien choisir son coin et bien examiner le poisson à la sortie.

## Remplacement : 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*

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 Toxicologie du 21<sup>ème</sup> siècle, par exemple) ont mis en évidence le besoin d'approches de modélisation pour soit analyser de manière intégrative les nombreuses données *in vivo* ou *in vitro* déjà existantes, ou soit 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 nous proposons de présenter deux de ces méthodes : la modélisation quantitative structure activité (QSAR pour Quantitative Structure-Activity Relationship) qui permet de relier la structure d'une molécule à son activité biologique, et l'extrapolation quantitative de résultats *in vitro* à des situations *in vivo*. Les approches seront illustrées par des travaux récents menés au sein de l'INERIS.

La modélisation QSAR sera introduite par son utilisation pour l'enregistrement des substances chimiques prévue par le règlement européen REACH. Le consortium du projet CALEIDOS a mené une analyse rétrospective sur les dossiers soumis à l'échéance du 30 Novembre 2010 pour évaluer l'acceptabilité et l'utilisation des modèles QSAR. Les résultats ayant montré un faible taux de dossiers contenant des modèles QSAR, des enquêtes auprès d'un panel d'experts ont été réalisées pour comprendre leurs réticences à utiliser des modèles QSAR. Le pouvoir prédictif de modèles QSAR pertinents pour l'enregistrement REACH a aussi été évalué, en particulier pour les effets génotoxiques. Les résultats montrent que l'application d'outils QSAR permet de prédire le potentiel mutagène de substances chimiques avec une très bonne fiabilité.

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 (par exemple, l'initiative des chemins d'effets adverses (AOP) 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 la pharmacocinétique afin de modéliser l'absorption, la distribution, le métabolisme, et les processus d'excrétion qui ne sont pas reproduits *in vitro*. 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 toxicocinétiques à fondement physiologique (appelés PBPK pour Physiologically Based Pharmacokinetic) qui permettent de simuler le devenir de substances dans des organismes vivants, et de modèles d'effets *in vitro* qui permettent de caractériser les essais *in vitro* en reliant l'exposition cellulaire à l'effet mesuré. Les modèles PBPK sont particulièrement adaptés pour ces extrapolations car tenant compte explicitement de la physiologie des individus. Cette approche sera illustrée pour la prédiction de l'hépatotoxicité de la coumarine (un ingrédient cosmétique) à partir des tests *in vitro* d'impédance sur cellules HepaRG et de la modélisation PBPK.

## **Approches génétiques et pharmacologiques chez la Drosophile pour l'étude de pathologies humaines**

**Hervé TRICOIRE**

*BFA, UMR8251, Université Paris Diderot/CNRS, 75 013 Paris cedex 13*

Le séquençage des génomes d'invertébrés (nématode et drosophile) en 1998 et 2000, suivi de celle du génome humain plusieurs années après, a permis d'illustrer l'importante conservation au niveau moléculaire existant entre des organismes évolutivement distants de plusieurs centaines de millions d'années. De fait, les études génétiques menées sur ces organismes et chez la souris ont montré une importante conservation des principales voies de transduction présentes chez les mammifères.

Permettant des études fonctionnelles à un moindre coût sur l'organisme entier et de nombreuses manipulations génétiques dans les 3 dimensions (espace, temps et intensité), ces organismes représentent un outil de choix dans un pipeline de découvertes de gènes et/ou de composés actifs dans des pathologies humaines.

Plusieurs exemples illustreront ces capacités dans des modèles drosophile de pathologies neurodégénératives et cardiaques. Les intérêts mais aussi les limites de ces modèles seront ensuite discutés.

## Exemple de méthode alternative en enseignement et formation chirurgicale

Catherine VOGT

Université Claude Bernard Lyon 1 - WASP science

Si la tendance générale montre l'intérêt grandissant de la simulation dans l'enseignement, force est de constater que le contexte réglementaire, avec la mise en application de la directive 2010-63, incite à généraliser l'utilisation de Méthodes Alternatives.

Plusieurs modèles sont disponibles et bien connus pour s'entraîner à la contention, au gavage et au prélèvement sanguin. Pour la chirurgie et en particulier pour la microchirurgie (chirurgie sous microscope), il y a près de 20 ans, les premières publications concernaient l'utilisation de pièces anatomiques issues des déchets de boucherie : comme du cou de poulet ou de dinde et plus récemment celle de modèles simples avec des pièces interchangeables (MD PVC Rat Model) ou de fin tube en plastique hydrogel (KEZLEX), proche de la texture des vaisseaux.

WASP science (<http://www.wasp-science.ch/WASP/Accueil.html>) a pour ambition de développer et de promouvoir un recours systématique à la substitution, par la validation de méthodes innovantes pour un enseignement pratique de qualité. Avec la volonté de limiter les déchets, ma démarche est de définir une problématique précise et d'y répondre avec des outils pédagogiques originaux, physiques ou organiques, prioritairement réutilisables et/ou biodégradables.

Quelle que soit leur nature, les supports permettent la reproductibilité et la standardisation d'exercices de difficulté croissante, englobant des éléments techniques des précédents, pour aboutir à la réalisation d'une procédure chirurgicale complexe. Pour chaque exercice, l'enseignant démontre la technique avec les même support et instruments, puis définit un objectif clair, mesurable et accessible aux stagiaires.

### **Un même support permet la réalisation de plusieurs entraînements :**

- Mise en place d'une puce d'identification
- Réalisation d'une anesthésie locale
- Asepsie cutanée
- Mise en place de champs
- Incision abdominale et suture en binôme.

***Une étude sur près de 80 stagiaires démontre un excellent niveau de satisfaction (100% en fin de formation, comme six mois plus tard), et un impact important : 88% des stagiaires ont modifié leur pratique suite à la formation.***

### **Substitut et microchirurgie :**

Dans le cadre de l'École de Chirurgie de Lyon, nous avons progressivement intégré plusieurs exercices ex vivo, dans le cadre du DIU de microchirurgie. Le support « Double horloge » décrit par Chan WY & Col. (*J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2008 – 2010*) et l'utilisation de pièces anatomiques ont permis de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les étudiants sont plus opérationnels dès leur première tentative in vivo, les échecs de sutures et complications immédiates au déclampage (hémorragie, thrombose) sont devenus plus rares.

Afin de développer un enseignement analogue à Phnom Penh, j'ai été confrontée aux difficultés d'obtenir des rats dans les standards européens, mais surtout aux risques sanitaires (H5N1, rage) liés aux denrées (*vaisseaux de porcs ou de poulets, trachée de poulet ou rats sauvages*) Ces éléments m'ont amené à envisager un nouveau type de substitut. Actuellement en cours d'optimisation-validation, il est largement disponible, peu coûteux et n'occasionne que peu ou pas de déchet.

## 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, in vivo. La 1<sup>ère</sup> consiste à créer et à sélectionner des hybridomes. L'immunisation d'un rongeur contre un antigène bien défini est préalable à la fusion des cellules spléniques avec des cellules tumorales. Les hybridomes ainsi créés sont injectés dans le péritoine de la souris, y prolifèrent, puis sont récoltés par ponction du liquide ascitique. Cette seconde étape entraîne globalement une grande souffrance chez les rongeurs.

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... Deux pays de la Francophonie se distinguent par leur législation en matière de bio-production : le Canada et la Belgique. Les mesures prises dans tous ces pays s'inscrivent dans l'esprit des recommandations de l'ECVAM. En effet, dès 1997, le Centre européen encourageant déjà le recours aux méthodes de production alternatives des hybridomes, in vitro (Source : Monoclonal Antibody Production - ECVAM Workshop 23)

Lorsqu'un anticorps monoclonal n'est pas disponible commercialement, le chercheur est confronté à un premier défi : produire cet anticorps in vitro. **La quantité d'anticorps** à obtenir conditionne le système de production à utiliser. L'ECVAM propose une sélection de techniques, subdivisée en 3 catégories de systèmes de production et de rendements. **La qualité des anticorps** souhaités, leur nature et leur degré « d'humanisation » conditionnent également les techniques de production. En passant des anticorps à 100% murins, aux anticorps chimériques, puis aux anticorps humanisés 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 enjeux économiques et en particulier **le coût de production** des anticorps constituent un autre paramètre important pour le chercheur. 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 et la production d'anticorps monoclonaux en particulier, avec le risque de délocalisation des entreprises.

Les enjeux éthiques de la méthode de l'ascite sont également essentiels. Dans la 1<sup>ère</sup> étape, lors de l'immunisation, la nature des adjuvants, le site et le volume d'injection seront choisis judicieusement. Durant la 2<sup>ème</sup> étape, l'inoculation par injection des hybridomes, in vivo, la croissance tumorale et le volume de prélèvement du liquide ascitique seront optimisés pour réduire la souffrance animale.

L'application concrète du principe des « 3 R'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.

## **PRIX OPAL 2014**

Identification et validation du carcinome mammaire spontané canin comme modèle des interactions entre régulateurs de croissance, obésité et cancer du sein

Laetitia Jaillardon

LDHVet – ONIRIS, Nantes

Le cancer apparaît à la suite de processus pathologiques variés qui se développent de façon complexe au sein des organismes vivants mettant en jeu de multiples phénomènes d'adaptation, de compensation et d'interactions, qu'il est impossible de récréer in vitro. Pour être performante, la recherche en oncologie doit utiliser des modèles d'études mimant au mieux la complexité des cancers humains, afin de permettre une meilleure compréhension de la biologie et de l'histoire naturelle des cancers, intégrées dans un organisme répondant à des contraintes environnementales et nutritionnelles variables.

La convergence entre les recherches en médecine oncologique vétérinaire et humaine permet d'une façon raffinée et sans utiliser d'animaux dédiés, de valoriser les données obtenues sur des animaux de compagnie pour modéliser certains cancers humains, du fait de l'exposition de ces animaux aux mêmes facteurs environnementaux que leurs propriétaires. Ceci permet donc de travailler sur des animaux qui développent spontanément des tumeurs dont les caractéristiques biologiques, anatomopathologiques et moléculaires sont potentiellement similaires à celles de l'Homme. Dans l'espèce canine, la durée d'évolution des maladies est environ sept fois plus rapide que chez l'Homme. L'identification de biomarqueurs et la mise en évidence de facteurs pronostiques, environnementaux et déclenchant des cancers sont donc beaucoup plus rapides. De plus, la taille des animaux permet de réaliser tous les prélèvements nécessaires à la réalisation simultanée de plusieurs études. En effet, l'approche thérapeutique principale de nombreux cancers chez le Chien consiste en l'exérèse des tumeurs, fournissant un matériel conséquent pour la recherche, sans préjudice additionnel pour l'animal. C'est le cas en oncologie mammaire, puisque le traitement de choix est l'exérèse de la totalité de la chaîne mammaire atteinte.

Notre travail étudie la chienne en cancérologie mammaire comparée et sa pertinence dans l'étude des relations entre obésité et cancer. Il est maintenant bien établi que l'obésité est un facteur de risque majeur dans le développement de nombreux cancers, dont le cancer du sein. Les facteurs de croissance leptine, système IGF (Insulin-Like Growth Factor) et insuline, œstrogènes, androgènes et prolactine sont impliqués dans cette augmentation du risque. Nous avons montré que la majorité des facteurs de croissance impliqués dans le lien entre obésité et cancer étaient présents dans le cancer mammaire de la chienne et que leur présence était, comme chez la Femme, associée à une valeur pronostique forte, particulièrement dans le cancer mammaire triple-négatif.

Nos résultats montrent la pertinence du modèle spontané canin pour l'étude du lien entre obésité et cancer du sein. Plus généralement, le recours aux chiens atteints naturellement de tumeurs pourrait apporter des méthodes complémentaires voire substitutives intéressantes à l'utilisation d'animaux de laboratoire pour l'étude de la biologie des cancers. Ceci, tout en améliorant considérablement la santé des animaux étudiés, qui pourraient profiter de médicaments spécifiques alors que leur confort et leur qualité de vie seraient préservés puisqu'ils sont maintenus dans leur environnement familial.

**RESUMES  
DES COMMUNICATIONS AFFICHEES**

## **Prédiction de l'hépatotoxicité induite par l'exposition chronique aux mélanges de substances utilisées dans les produits cosmétiques**

**Sophie TENG, S. Barcellini-Couget, G. De Sousa, R. Rahmani, A.R.R. Péry**

*INERIS - Unité METO*

L'interdiction de la mise sur le marché de produits cosmétiques ayant été testés sur les animaux oblige l'industrie des cosmétiques à développer des méthodes alternatives pour assurer la sécurité des consommateurs. C'est dans ce contexte que nous présentons des modèles mathématiques dans le but de prédire l'hépatotoxicité par extrapolation de la cytotoxicité *in vitro* de cellules HepaRG exposées pendant quatre semaines à trois substances hépatotoxiques, seules et en mélange binaires et ternaire.

Les données de cytotoxicité ont été obtenues par impédance cellulaire. Elles ont été analysées par des modèles de toxicocinétique/toxicodynamie (TK/TD) décrivant la biocinétique et la biodynamique des composés dans le milieu et les cellules exposées. Ces modèles ont permis de prendre en compte la variation au cours du temps de la concentration d'exposition et d'apporter une assise mécanistique à l'analyse des données.

Les données des substances seules ont été analysées en premier. Ensuite, les paramètres estimés par ces derniers modèles ont été implémentés dans les modèles TK/TD des mélanges en considérant les approches d'additivité des concentrations et d'indépendance d'action dans chaque mélange. Les analyses ces données par ces modèles ont révélé que les effets des substances contenues dans chacun des mélanges exerçaient leurs effets de manière indépendante.

Dans une dernière étape, un modèle toxicocinétique a permis d'extrapoler ces résultats de l'*in vitro* à l'*in vivo* pour prédire la toxicité des mélanges chez l'Homme.



## **Modélisation mathématique et informatique des barrières épithéliales et endothéliales**

**Nesrine GHARBI**

*INERIS UR METO*

Thèse suivie à l'INERIS (DRC/VIVA/METO) par Frédéric BOIS - [Frederic.BOIS@ineris.fr](mailto:Frederic.BOIS@ineris.fr)

La modélisation mathématique est un des ingrédients essentiels de l'extrapolation quantitative des résultats de test in-vitro vers l'organisme humain, alternativement aux expérimentations animales.

Nous développons des modèles en champ continu (Off-lattice) décrivant le comportement de cellules individuelles. Ces cellules sont modélisées comme des polygones interagissant à leurs sommets sous l'influence des forces générées par les jonctions protéiques intercellulaires (simulations Vertex-based). L'évolution de chaque cellule est gouvernée par le mouvement de ses sommets qui obéit à une équation de mouvement déterministe avec une dynamique de premier ordre basée sur la localisation des sommets, le contrôle de la surface disponible et le volume des cellules voisines. Pour coder ce modèle nous utilisons la librairie C++ Chaste développée à l'Université d'Oxford. Afin de simuler correctement les expérimentations sur cultures cellulaires invitro, nous tenons compte d'un ensemencement cellulaire initial aléatoire, de la surface disponible (un puits de culture circulaire), de l'inhibition de contact de la division cellulaire, et de la mort cellulaire.

Ce modèle a été appliqué à la formation d'une barrière cellulaire étanche. Pour le valider à l'aide de données expérimentales il a été couplé à un modèle différentiel de la diffusion du jaune de Lucifer au travers d'une barrière hémato-encéphalique reconstituée in vitro. Notre modèle aura des applications en toxicologie, pharmacologie et physiologie.

Mots clés : Modèles cellulaires de type vertex, Biologie systémique, Modélisation mathématique, Toxicologie prédictive

## **Qualification d'outils *in silico* en vue de l'élaboration d'une stratégie *in silico/in vitro* pour l'évaluation du potentiel œstrogénique de substances chimiques**

**Enrico MOMBELLI, Romain NICOCIA, Selim AIT-AISSA**

*Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte*

Depuis plusieurs années, une prise de conscience scientifique et sociétale a pu être remarquée sur les effets nocifs des perturbateurs endocriniens (PE). Dans ce contexte, le récepteur pour les œstrogènes (RE) représente une cible biologique particulièrement étudiée car sa fonction biologique peut être perturbée par plusieurs familles de substances chimiques.

Des méthodes *in vivo* ou *in vitro* peuvent être utilisées pour caractériser les PE qui ciblent ce récepteur. Cependant un recours systématique à ces méthodes serait associé à un fort coût économique et éthique au regard des milliers de substances à évaluer. C'est pourquoi, le couplage entre outils *in silico* et *in vitro* pourrait représenter une option intéressante. Au sein de cette stratégie, les modèles computationnels auraient le rôle de hiérarchiser les substances chimiques en fonction de leurs affinités de liaison pour le RE afin d'optimiser, dans un second temps, le recours aux méthodes *in vitro*.

Pour développer cette approche, nous nous sommes focalisés sur le RE et sur la qualification de trois outils *in silico* (Disruptome, Boîte à outils QSAR de l'OCDE et QSARINS). Les substances identifiées comme prioritaires par ces outils ont été testées *in vitro* sur un modèle cellulaire ayant intégré de manière stable un gène rapporteur luminescent (Luciférase) placé sous le contrôle transcriptionnel du RE.

Nos résultats comparatifs *in silico/vitro* montrent que l'étape computationnelle permet d'enrichir en vrais positifs la liste des substances à tester *in vitro*. Cependant, la présence de prédictions incorrectes démontre que la prise en compte de certaines typologies chimiques n'est pas optimale.

## The role of telomere instability in *in vitro* Genotoxicity assessment of ethyl 4-hydroxybenzoate

**F. Finot<sup>a</sup>, R. M'Kacher<sup>b</sup>, I. Mouche<sup>a</sup>, D. Souverville<sup>a</sup>, S.Négrault<sup>a</sup>, O. Cariou<sup>a</sup>, A. Essahli<sup>a</sup>, N.Prigent<sup>a</sup>, J.Saul<sup>b</sup>, F.Paillard<sup>a†</sup>, P Lafouge<sup>a</sup>, L. Sabatier<sup>b</sup> and J. Clements<sup>c</sup>**

<sup>a</sup> Covance Laboratory SAS, Porcheville, France

<sup>b</sup>Radiobiology and Oncology laboratory, CEA, DSV/iRCM, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>c</sup>Covance Laboratories Yorkshire HG3 1PY, England

Telomere length has been proposed as a marker of mitotic cell age and as a general index of human organism aging. Recent studies have documented the role of telomere dysfunction in breast carcinoma. The impact of telomere status on the response to chemical genotoxins has not been studied to any great extent. In our Porcheville facility<sup>1</sup>, we evaluated the effects of ethyl 4-hydroxybenzoate (antibacterial/antifungal agent used in cosmetic preparations) in a battery of screening and Regulatory *in vitro* genotoxicity tests. We also investigated the potential correlation of Ethyl 4-hydroxybenzoate exposure in the presence and in the absence of metabolic activation (S-9), with the mutagenic effect and telomere dysfunction.

Ethyl 4-hydroxybenzoate (CAS n°120-47-8) was evaluated in screening genotoxicity tests (Ames, Micronucleus), and in Regulatory tests up to 5000µg/plate (Ames), up to cytotoxic concentrations 300 to 600µg/mL (Mouse Lymphoma Assay, Human Lymphocyte Micronucleus, with formulation analysis). The Human lymphoblastoid cell line (TK6), the mouse lymphoma cell line (L5178Y) and human lymphocytes were used. The micronucleated cells and telomere and centromere staining were scored using Metasystem platform. Telomere dysfunction was assessed using Q-FISH technique and chromosomal aberrations were performed using telomere and centromere staining.

Significant increases (without dose effect) in MF were noted in the MLA test (GLP) in 3-hour treatment with S-9, as well as significant increases in micronuclei in L5178Y cells after 3-hour treatment with S-9 and at two sampling times, short (+S9) and long (-S9) in TK6 cells.

Significant increases in micronucleus frequencies were observed (without dose effect) after 3-hour exposure in the presence of S-9 following treatment of human lymphocytes. Unstable chromosomal aberrations related to S-phase exposure were scored in the presence of metabolic activation in human lymphocytes. The investigation of basic telomere status in TK6, L5178Y and human lymphocytes demonstrated drastic telomere shortening in both cell lines and higher variations of telomere length of human lymphocytes. The response human lymphocytes with drastic telomere shortening to different concentrations of ethyl 4-hydroxybenzoate was compared to that observed in both cell lines. The discrepancy of the response of human lymphocytes could be related to basal telomere status. These findings may go some way to explain the discrepancy in response of L5178Y and TK6 cells compared to human lymphocytes after Ethyl paraben exposure.

This study is the first to link telomere length and genotoxicity of ethyl 4-hydroxybenzoate in the presence of metabolic activation and provides additional evidence that telomere length may be a proxy for underlying inter-individual sensitivity.

**Mots Clés :** Telomere Length, Telomere, Chromosomal Aberration

## **A new tool for genotoxic risk: Reevaluation of cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay following telomere and centromere staining.**

**F.Finot<sup>a</sup>, N.Zagua<sup>b</sup>, L.Morat<sup>b</sup>, A.Essahli<sup>a</sup>, N.Prigent<sup>a</sup>, O.Cariou<sup>a</sup>, F.Paillard<sup>a†</sup>, L.Heidingsfelder<sup>c</sup>, M.Ricoul<sup>b</sup>, W.Hemplel<sup>b</sup>, J.Clements<sup>d</sup>, L.Sabatier<sup>b</sup>, R.M'kacher<sup>b</sup>.**

<sup>a</sup> *Covance Laboratory SAS, Porcheville, France*

<sup>b</sup> *Radiobiology and Oncology laboratory, CEA, DSV/iRCM, Fontenay-aux-Roses, France*

<sup>c</sup> *MetaSystems GmbH, Robert-Bosch-Str. 6 D-68804. Altlußheim, Germany*

<sup>d</sup> *Covance Laboratories Yorkshire HG3 1PY, England*

Distinguishing between clastogens and aneugens is necessary in order to evaluate genotoxic risk. The cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay is international gold-standard method for determining the genotoxic potential of a substance. Micronuclei (MN) can be formed in dividing cells that contain either acentric or whole chromosomes. The introduction of telomere and centromere staining offers the potential to render MN scoring more efficient and sensible. In this study, we improved the detection of all type of MN leading to a significant reevaluation of clastogenic and aneugenic effect and increase of the sensibilité of CBMN assay following telomere and centromere assay. The human lymphoblastoid cell line (TK6), in the mouse lymphoma cell line (L5178Y P53 deficient) and human lymphocytes were exposed for 3 hours to various concentrations of aneugen (vinblastine), clastogen (Mitomycin C) and a negative control (Pyrene). The highest concentrations of each induced only weak cytotoxicity. Chromosomal aberrations were scored following telomere and centromere staining. The quantification of telomere length was performed using the Q-FISH technique. The association of telomere and centromere staining to CBMN made it not only possible to distinguish between clastogens (MN without centromere signal) and aneugens (MN with centromeric signal) but also to increase the sensitivity of the CBMN assay. In addition, a higher sensitivity of cell lines to aneugens and clastogens compared to human lymphocytes was demonstrated. Drastic telomere shortening and the loss of telomeric sequence in both cell lines before exposure compared to human lymphocytes was found and was associated with the presence of dicentric chromosomes without acentric fragments. These data suggest the important role of telomeres in protecting the ends of chromosomes and preventing chromosome fusion in response to genotoxic agents. In this work, we demonstrate for the first time the application of telomere and centromere staining to assist the scoring of induced MN, making a new step in the classification of substances and the response to genotoxic risk as it associated the quantification of telomere length with the scoring of MN.

**Mots Clés :** Genotoxicity, Telomere, Micronucleus

# Optimisation de la transgénèse Crisp **R** | éduire emplacer affiner

Irmine Ferreira<sup>1</sup>, Marcio Do Cruzeiro<sup>2</sup>; Rémi Pierre<sup>2</sup>; Chrystophe Ferreira<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INSERM U 970, 56 rue Leblanc, 75015 PARIS/Université Paris Descartes, 12 rue de l'école de médecine, 75006 Paris, <sup>2</sup> PRHTEC – Institut Cochin - INSERM U1016 - Paris, <sup>3</sup> plateforme ANIMA5, Université Paris Descartes, 12 rue de l'école de médecine, 75006 Paris

La création de modèles transgéniques implique classiquement la production d'animaux parmi lesquels seuls ceux portant la modification génétique d'intérêt seront conservés (fondateurs). La part des « non utilisés » est encore augmentée par les techniques actuelles comme l'approche Crispr/Cas9 car elles conduisent à la génération d'un très grand nombre d'animaux potentiellement fondateurs mais susceptibles de porter également des mutations additionnelles non désirées. Nous proposons ici une approche combinant deux techniques de biologie moléculaire permettant de tester et valider les paramètres expérimentaux avant la production d'animaux respirants.

L'ADN de blastocystes obtenus après développement *ex vivo* d'embryons injectés avec les éléments permettant la mutagenèse ponctuelle ciblée d'un gène murin d'intérêt par stratégie Crispr/Cas9 est extrait et analysé.

L'analyse par HRM permet de vérifier la modification de la séquence cible. Cette approche rapide permet également de tester différents SgRNA pour sélectionner le plus efficace ou encore différentes concentrations et paramètres d'injection.

L'analyse par ddPCR permet de vérifier la mutation hétérozygote ou homozygote du site cible. Elle permet également de quantifier le nombre d'intégrations non spécifiques.

La combinaison de ces techniques permet d'optimiser l'efficacité de transgénèse *in vivo* (**raffinement**) mais sur des embryons non réimplantés (**remplacement**) évitant la naissance de souriceaux à génotyper.

Cette validation préalable permet, lors de la création des modèles, de générer moins d'animaux (**réduction**), les souriceaux nés portant dans une très large proportion la modification génétique désirée.

Dans le contexte du respect de la règle des 3R, leur mise en œuvre dans les centres produisant des lignées transgéniques est à envisager.

Abbreviations: HRM: High-Resolution Melting; ddPCR : digital droplet PCR

Mots-clés: Transgénèse, Crispr/Cas9; 3R

## **Recherche de méthodes de remplacement en Radiotoxicologie : les banques d'échantillons biologiques**

**Nina M Griffiths, Valérie Quéméneur, Jaime Angulo, Anne Van der Meeren**

*CEA/DSV/iRCM/SREIT, Centre DIF, Bruyères le Châtel, 91297 ARPAJON, France*

La notion de « réduire » le nombre d'expérimentations animales implique également l'exploitation maximale des données obtenues. Dans cet objectif, le Laboratoire de RadioToxicologie a récemment réalisé un inventaire des échantillons provenant d'expérimentations animales de contamination interne par des radioéléments, (principalement de rats et de primates non humains) réalisées depuis une trentaine d'années. Une base de données interne avec les conditions expérimentales documentées a été construite. Elle regroupe les informations d'environ 1500 blocs de paraffine de tissus provenant d'expérimentations menées avec des objectifs tels que :

1. étude des effets tardifs des actinides,
2. étude de la réponse inflammatoire et les effets pathologiques à court et à moyen terme
3. biodistribution des actinides et l'étude de différents protocoles de décorporation.

Les informations issues de cet inventaire font partie d'une base de données européenne « STORE », portant l'existence et les caractéristiques de ces échantillons à la connaissance de la communauté scientifique. Les progrès énormes de certaines approches technologiques permettent à l'heure actuelle l'exploitation de tissus conservés en paraffine (extraction d'ARN, laser ablation ICP-MS, spectrométrie de fluorescence X...). Ainsi, un nouveau regard peut être porté sur ces banques d'échantillons biologiques et leur utilisation dans la recherche en radiotoxicologie.

## **Recherche de méthodes de Remplacement en Radiotoxicologie pour l'étude de la biodistribution du plutonium.**

**Anne Van der Meeren, Olivier Grémy, Jaime Angulo, Nina M Griffiths**

*CEA/DSV/iRCM/SREIT, Centre DIF, Bruyères le Châtel, 91297 ARPAJON, France*

Après contamination accidentelle ou expérimentale avec les actinides, tels que le plutonium, l'activité mesurée dans les urines est le reflet du transfert du radiocontaminant du site de contamination vers le sang. Afin de limiter les expérimentations animales nous avons développé deux approches *in vitro* visant à prédire le comportement d'actinides dans l'organisme et plus particulièrement leur transférabilité vers le sang. Celle-ci dépend principalement des propriétés physico-chimiques du radiocontaminant, et notamment de leur solubilité. Le premier modèle repose sur l'internalisation du plutonium par des macrophages humains (lignée monocyttaire THP-1 différenciée) et l'évaluation du relargage du Pu solubilisé. Le second est un test acellulaire dans lequel le plutonium est retenu dans un compartiment statique mimant un site de rétention *in vivo*, et relargué dans un compartiment dynamique. Sur ces deux modèles, l'efficacité d'agents chélatants peut être évaluée. Ces *modèles in vitro* ont été validés par leur comparaison à des données animales d'excrétion urinaire obtenues au laboratoire après contamination pulmonaire de rats. Différentes formes de plutonium, de solubilité variable ont été utilisées.

Les données obtenues sur les modèles cellulaires et acellulaires sont en accord avec les données obtenues *in vivo* : plus les composés sont solubles, moins ils sont retenus dans l'organisme, dans les cellules ou sur des bioligands. Que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, l'excrétion/libération du plutonium est accélérée par un agent chélatant.

Deux modèles simplifiés sont disponibles pour mimer, en première approche, le comportement d'actinides dans l'organisme et leur accessibilité à un agent chélatant.

*Les auteurs remercient AREVA pour son support financier.*

**EPISKIN Academy, une initiative pour promouvoir les méthodes alternatives à l'expérimentation animale par un partage de l'expertise sur les tissus humains reconstruits.**

**Christian Pellevoisin, Alain Alonso, Nathalie Seyler**

*EPISKIN Academy, Lyon, 69366, France*

Dans le domaine scientifique, ce XXIème siècle voit l'accélération du processus de remplacement de l'animal par des méthodes prédictives basées sur des approches *in silico*, *in chemico* et *in vitro*. Cela, est particulièrement vrai en toxicologie grâce à un énorme effort de recherche qui permet l'avènement de méthodes alternatives à l'animal scientifiquement valides et, pour certaines, validées réglementairement.

Cela passe aussi par la reconnaissance et l'appropriation par tous les acteurs, publics et industriels de ces méthodes de remplacement de l'animal. La dissémination de ces méthodes en dehors des communautés impliquées dans leur développement ou déjà utilisatrices pour des raisons réglementaires, nécessite un effort de communication et d'éducation. De même, il est important que les futures générations de chercheurs et de toxicologues soient dès maintenant sensibilisées aux nouveaux enjeux de leur profession pour qu'ils soient rapidement opérationnels et acteurs du changement.

C'est dans cet esprit que nous avons créé le projet EPISKIN Academy pour partager notre expertise et notre savoir-faire. EPISKIN, filiale de L'Oréal, leader sur son marché, produit des tissus humains reconstruits pour des applications en recherche et en évaluation de la sécurité et de l'efficacité des produits chimiques, cosmétiques, dermatologiques et des dispositifs médicaux.

En partenariat avec différentes structures, publiques et privées, EPISKIN Academy organise des workshops et intervient dans des formations dans différentes régions du monde pour promouvoir les méthodes alternatives et les illustrer par des applications sur les tissus humains reconstruits.

Ce poster présente différentes actions d'EPISKIN Academy menées ces 2 dernières années. L'analyse du questionnaire remis aux participants (n=95) des workshops pratiques donne une image de la population touchée, de leur laboratoire et de leur expérience de l'*in vivo* et/ou de l'*in vitro*.



## **Les cellules épithéliales du lait, une alternative aux biopsies mammaires chez les ruminants laitiers.**

**Marion Boutinaud<sup>12</sup>, Lucile Hervé<sup>12</sup>, Perrine Debournoux<sup>12</sup>, Sandra Wiart<sup>12</sup>, Vanessa Lollivier<sup>123</sup>**

<sup>1</sup>INRA UMR1348 PEGASE, F-35590 Saint-Gilles, France

<sup>2</sup>INRA Agrocampus Ouest, UMR1348 PEGASE, F-35000 Rennes, France

<sup>3</sup>Université européenne de Bretagne, F-35000 Rennes, France

Le lait est produit dans la mamelle par les cellules épithéliales mammaires (CEM). L'étude de la fonction de lactation requiert de récolter du matériel biologique. La méthode classique de collecte de tissu mammaire correspond à une intervention chirurgicale par biopsie qui ne permet pas un échantillonnage simple et répété, sans endommager le tissu mammaire. En revanche, le lait contient des CEM progressivement exfoliées de l'épithélium au cours de la lactation. Le développement d'une méthode de purification des CEM à partir du lait par séparation immuno-magnétique (Boutinaud et al., 2008) permet une collecte non-invasive de matériel cellulaire. Les CEM purifiées pourraient constituer une alternative aux biopsies pour l'étude des transcrits mammaires chez les ruminants laitiers. La pertinence de l'utilisation des CEM du lait a été montrée du fait de la cohérence entre les variations des niveaux d'expression des transcrits mammaires dans les CEM du lait et les variations de production et de composition du lait chez la vache et la chèvre. En comparant nos données à celles obtenues par biopsies mammaires, nous avons montré que les CEM purifiées du lait représentent une source de transcrits mammaires pertinente pour étudier la synthèse du lait. Néanmoins, les transcrits extraits de ces cellules sont particulièrement sensibles à la dégradation. En conclusion, les CEM isolées à partir de lait sont une source pertinente et non invasive d'ARN mammaires qui peut être utilisée pour étudier l'effet de différents facteurs d'élevage (monotraitement, alimentation, statut endocrinien, photopériode, stade de lactation) sur la production et la composition du lait.

## **L'imagerie in vivo: une méthode alternative pour l'étude des maladies infectieuses chez le primate non humain**

**Catherine Chapon<sup>1-2</sup> and Roger Le Grand<sup>1-2</sup>**

<sup>1</sup>. *Laboratory of Imaging of Infection and Immunity, IDMIT Infrastructure, CEA iMETI/Division of Immuno-Virology, Fontenay-aux-Roses, France*

<sup>2</sup>. *Center of Immunology of viral infections and autoimmune diseases (ImVA), IDMIT Infrastructure, CEA iMETI/Division of Immuno-Virology, Université Paris Sud, Inserm U1184, Fontenay-aux-Roses, France*

Les approches utilisant l'imagerie in vivo pour l'étude des maladies infectieuses chez le primate non humain (PNH) ne sont pas encore très répandues. Ceci s'explique en partie par l'accès limité à des structures et des équipements adéquats pour l'imagerie chez le gros animal en laboratoire de confinement biologique pour les pathogènes humains de classe 2 et 3. Le centre IDMIT est une infrastructure nationale dont l'objectif est de fournir à la communauté scientifique des ressources pour l'étude des maladies infectieuses chez le PNH. IDMIT est constitué de laboratoires de recherches et de plateformes technologiques (cytométrie de flux et masse, immunomonitorage, expérimentation et bien-être animal, imagerie in vivo).

Les principaux objectifs du laboratoire d'Imagerie de l'Infection et de l'Immunité sont de développer des approches permettant le suivi longitudinal et minimalement invasif de l'infection, de la réponse immune de l'hôte à l'infection et aux traitements, et de l'impact de ces traitements sur la persistance des pathogènes. L'imagerie in vivo, en réduisant les procédures invasives, peut contribuer au raffinement de l'utilisation des PNH.

Nous avons ainsi développé des approches d'imagerie par fluorescence in vivo chez le PNH pour étudier les événements cellulaires précoces post-vaccination contre le VIH dans le but de mieux comprendre les mécanismes menant à l'induction de la réponse immunitaire.

Différentes modalités d'imagerie (TEP, imagerie optique) seront accessibles au sein de cette plateforme pour permettre le suivi de l'infection, de la réponse immune de l'hôte et des traitements chez le PNH en laboratoire de confinement biologique de niveaux 2 et 3.

## **Bovine primary cells as a new resource to mine extra-embryonic phenotypes *in vivo***

**I. Hue<sup>a</sup>, D. Evain-Brion<sup>b,c,d</sup>, T. Fournier<sup>b,c</sup> and S. A. Degrelle<sup>a,b,c,d</sup>**

<sup>a</sup>INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78352 Jouy-en-Josas, France;

<sup>b</sup>INSERM, UMR-S1139, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris F-75006, France;

<sup>c</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris F75006, France; <sup>d</sup>Fondation PremUp, Paris, F-75006, France.

In addition to a nourishing role towards the embryo, extra-embryonic tissues (EET) contribute to early embryonic patterning, primitive hematopoiesis and foetus health in response to maternal metabolism. Of major importance for livestock or human, knowing these cell types better is a need. Taking advantage of a species where EET are accessible easily, in large amount and prior to implantation, we detailed *in vitro* and *in vivo* the phenotypes encountered in bovine EET at Day18. After a week of culture, each cell type has modulated a part of its *in vivo* characters: gene expression, for instance. However, ECM-independent gene cores were identified that included the *in vivo* micro-dissected cell types: extra-embryonic ectoderm (or trophoblast: bTC), endoderm (bXEC) and mesoderm (bXMC). Cellular phenotypes appeared specific, evidencing adhesive preferences to extra-cellular substrates (bTC, bXEC) or flexibility towards nature and spatial distribution of such substrates (bXMC). Undergoing an Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) at gastrulation, XMCs loose the epithelial characters that were those of an embryonic epithelium (the epiblast), thereby acquiring a potential to behave on a single cell basis and migrate slowly, as visualized on micro-patterns. They also face different extra-embryonic epithelia to form chorion, yolk sac and allantois. Doing so, different functions arose that were *in silico* detected and *in vivo* corroborated at D21 or D25. Moreover, prior to morphological streak detection, bXMCs surrounding the embryonic disc were *BMP4*<sup>+</sup>, guided or eased in their migration by a radial expression of CD44 or SDF1 (by the underlying bXECs) before extending as a “crinoline” in the elongation axis. We therefore envision these data as a complementary resource to characterize exit from pluripotency into extra-embryonic lineages and analyze how extra-embryonic phenotypes evolve under adverse conditions, thus contributing to compromised placental or fetal development in eutherians.

PremUp foundation (S.A.D. post-doctoral fellowship), INRA funding: ACI PHASE 2008, 2009, AIP AGROBI to I. Hue & EMBIC European network of excellence headed at INRA by O. Sandra.

## Nouveaux biomarqueurs d'évaluation de la perturbation endocrinienne en microplaque sur lignée cellulaire placentaire humaine

Wakx, A.<sup>1,2</sup>; Dutot, M.<sup>1</sup>; Rat, P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire, UMR CNRS 8638 COMETE, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>2</sup> Fondation Prem'Up, Paris, France

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont omniprésents et peuvent avoir des effets adverses sur la santé humaine. Certains plastifiants largement utilisés, tels que le mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) et le bisphénol A (BPA), sont des PE reconnus mais peu d'informations sont disponibles en ce qui concerne les nouveaux plastifiants. De plus, il n'existe actuellement que peu de modèles *in vitro* permettant l'étude de la perturbation endocrinienne ; notre objectif est donc de développer un modèle cellulaire simple et rapide de détection des PE en utilisant des PE connus dans le but de passer au crible les nouveaux plastifiants.

La lignée de cellules placentaires humaines JEG-3 a été incubée avec du MEHP ou du BPA pendant 72h. L'activation du récepteur de dégénérescence P2X7 a été évaluée par le test cytofluorimétrique au YO-PRO-1. La libération de deux hormones placentaires, l'hormone placentaire lactogène (hPI) et l'hormone chorionique gonadotrope (HCG), a été déterminée dans les surnageants cellulaires par technique ELISA.

Après 72h d'incubation, le MEHP et le BPA activent le récepteur de dégénérescence P2X7 sans induire de perte de viabilité. Aucun des deux PE testés ne modifie la sécrétion d'HCG mais tous deux augmentent la libération d'hPI.

La lignée de cellules placentaires humaines JEG-3 sécrète des hormones placentaires et nous a permis de mettre en évidence une perturbation endocrinienne induite par des plastifiants après exposition sur un temps court ainsi que l'activation du récepteur de dégénérescence P2X7. Notre modèle cellulaire *in vitro* semble donc révéler des phénomènes de toxicité endocrinienne et pourraient être proposés dans les études réglementaires d'évaluation des nouveaux plastifiants ou des PE.

## **La technologie de l'impression 3D au service des 3R : un exemple dans la formation des utilisateurs et du personnel en animalerie.**

**Susana Gomez, Laurie Houdebine, Gaetan Girault, Aurelia Fosse**

*Inserm U1141*

L'impression 3D est un procédé qui permet de produire un objet par fabrication additive à partir d'un fichier numérique. Elle trouve des applications dans divers domaines comme l'industrie, l'art, l'éducation et la recherche. Au fil du temps, l'impression 3D est devenue une technique facile d'utilisation et accessible à tous.

Au sein de l'Hôpital Robert Debré à Paris, la plateforme d'animalerie UMR 1141 Inserm Paris 7 travaille principalement sur des rongeurs nouveau-nés et juvéniles. Notre animalerie reçoit un grand nombre de stagiaires pour de courtes durées, qui n'ont aucune formation en expérimentation animale et doivent être formés sur place. Nous avons rarement à notre disposition des animaux nouveau-nés pour former les utilisateurs et le personnel vacataire. Nous avons développé des modèles 3D de rongeurs nouveau-nés C57LB6 par souche et par tranche d'âge en haute définition. Ils permettent diverses applications au sein de la plateforme d'animalerie, comme la différenciation du développement, la manipulation, le sexage, l'identification, l'euthanasie, les sites d'injection ainsi que les explications annexes liées à l'utilisation des animaux. Ces modèles sont de faible coût en comparaison de leurs homologues vivants et ils sont réutilisables.

Nous avons proposé nos modèles 3D pour une utilisation dans d'autres animaleries et nous espérons partager nos modèles pour favoriser l'enseignement avec moins d'animaux.

L'impression 3D est une méthode alternative d'accès facile et à bas coût, en expérimentation animale, ses usages sont multiples.

**Le comité d'organisation remercie vivement les sponsors**  
pour leur soutien au Colloque OPAL et FRANCOOPA :

