

NUMÉRO SPÉCIAL COLLOQUE

**RÉDUIRE LE RECOURS
À L'ANIMAL DE LABORATOIRE :
QUELS MOYENS ? QUELLES LIMITES ?**

*P*armi l'ensemble des actions promues et soutenues par l'OPAL en faveur du respect des animaux de laboratoires, l'application du principe des « 3 R » énoncé par Russell et Burch en 1959 fait aujourd'hui référence chez les expérimentateurs du monde entier et constitue l'un des thèmes de prédilection de l'OPAL.

Un premier colloque organisé en octobre 2003 et intitulé "Remplacer l'animal de laboratoire : réalités et perspectives" avait fait le point sur le développement de

différentes méthodologies utilisées en recherche biomédicale permettant de diminuer le recours à l'animal de laboratoire, voire de le remplacer.

L'OPAL a choisi de poursuivre la déclinaison de la règle des 3 R en organisant une journée en octobre 2008 à la Maison de la Chimie sous la présidence de Pierre Tambourin, Directeur Général de Genopole®, sur le thème : « Réduire le recours à l'animal de laboratoire : Quels moyens ? Quelles limites ? » ■

Sommaire

Introduction	3
1. L'expérimentation animale : les chiffres	4
2. Harmonisation de la réglementation dans l'industrie pharmaceutique.....	6
3. Impact des approches alternatives : quelques exemples.....	9
4. Les enjeux de l'imagerie non invasive du petit animal.....	13
5. Maîtrise des facteurs environnementaux et validité des résultats expérimentaux	15
6. La génomique et ses applications...	19
7. L'évolution de la toxicologie a-t-elle conduit à une réduction ?	21
Conclusion	23

Introduction

Pierre Tambourin

Directeur Général de Genopole®

Dans son discours d'ouverture, Pierre Tambourin a d'abord rappelé l'approche classique de la réduction en évoquant plusieurs méthodes connues pour diminuer le nombre d'animaux utilisés tout en permettant l'obtention de données comparables ou encore d'obtenir plus d'informations avec le même effectif d'animaux.

C'est ainsi que la réduction des facteurs de variabilité inter-individu par la maîtrise des facteurs environnementaux se traduit par un gain dans l'homogénéité des sujets expérimentaux en réponse à un protocole d'incitation et permet de ramener les besoins en animaux à la stricte valeur mathématique statistiquement représentative des lots.

Plus récemment, le développement des techniques d'imagerie *in vivo* du petit animal permet non seulement de réduire progressivement le caractère invasif des explorations mais aussi de réduire le nombre d'animaux utilisés au travers d'études longitudinales où chaque animal devient son propre contrôle.

Plus récemment encore, la reconnaissance mutuelle de tests au niveau international (ex. :

ICH) a pour objectif d'éviter la duplication des essais avec pour conséquence directe la diminution de l'utilisation de l'animal de laboratoire.

Ainsi dans REACH, les points de réduction sont dans le partage des données, la réalisation de tests *in vitro* avant les tests *in vivo* et la proposition d'essais.

L'arrivée de nouvelles techniques d'analyse de la structure et de l'expression des gènes à haut débit suscite beaucoup d'espoir. Les « omiques » : « génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique, etc. » permettent d'étudier à grande échelle les différents niveaux d'intégration de l'organisme et laisse entrevoir qu'un jour, certaines évaluations *in vivo* pourraient être remplacées par des profils de révélation génique.

C'est ainsi que la toxicogénomique apporte sa contribution à la productivité de la démarche toxicologique : criblage à haut débit, profils réceptoriels, génotoxicité...

Cependant, Pierre Tambourin a rappelé que 95 % des gènes non codants jouent un rôle et que de fait, la génomique et ses applications ne peuvent pas constituer une solution unique pour réduire le recours à l'expérimentation animale. ■

1

L'expérimentation animale : les chiffres

Virginie Vallet-Erdtmann

*Ministère de l'enseignement supérieur
et de la recherche*

La pratique des chiffres est incontournable pour un scientifique, car les chiffres représentent la seule façon valable d'objectiver les observations : les chiffres, obtenus de façon méthodique par le chercheur, sont utilisés pour conclure sur la véracité des hypothèses qui ont motivé les expérimentations. Ils permettent de quantifier des observations et de faire des comparaisons. Malgré tout, même si les chiffres inspirent confiance, il ne faut pas pour autant les croire les yeux fermés et, on le sait, il faut toujours rester méfiant et vigilant. En effet, les chiffres obtenus sont-ils fiables ? Tout scientifique sait pertinemment que les biais sont les pièges les plus pernicieux qui soient, puisqu'il s'agit d'erreurs commises à son insu. Les méthodes utilisées doivent donc être définies avec la plus grande attention avant leur mise en œuvre et critiquées après leur pratique.

Dans le cas présent, il s'agit de savoir si le nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales est en diminution. Cette question est capitale puisque, même si la société soutient largement le recours à l'expérimentation animale pour lutter contre les maladies, diminuer le nombre d'animaux utilisés tout en obtenant des résultats scientifiques de valeur est le but de tout honnête homme.

Pour répondre à la question, le Ministère de la recherche effectue, tous les trois ans, auprès des établissements où se pratiquent des expériences utilisant l'animal (EEA), une enquête relative à l'utilisation des animaux vertébrés comme l'impose la directive 86/609/CEE. L'enquête ne concerne pas les embryons et les animaux envoyés à

l'étranger. Les animaux d'élevage ne sont pas déclarés par les établissements fournisseurs mais par les établissements les utilisant.

Au cours de la collection des données, un certain nombre de biais peuvent s'accumuler à chacune des étapes de l'enquête :

- *identification des établissements* : la liste fournie par le Ministère de l'agriculture n'est pas toujours à jour (fermeture d'établissements, nouveaux agréments, etc.).
- *méfiance des interlocuteurs* vis-à-vis de la société enquêtrice.
- *pertinence des répondants* : l'identification du responsable de l'EEA n'est pas toujours évidente.
- *compréhension des items* : le cadre de l'enquête a été défini au niveau européen (8 tableaux) sans aucune latitude laissée aux États membres pour modifier les titres des colonnes. Si on prend l'exemple du tableau 1, il n'y a pas de colonne spécifique pour les animaux nés dans l'établissement. Ceux-ci sont alors comptabilisés dans la colonne 1.4.

Autre difficulté soulevée par l'énoncé des colonnes : la notion d'animal d'expérimentation. Pour les animaux provenant d'établissements fournisseurs agréés, c'est assez simple : ils ne sont pas dénombrés par l'établissement fournisseur mais par l'établissement qui les utilisera. Mais au cas où l'établissement fournisseur est aussi un EEA, comment seront comptabilisés les animaux ?

Tableau 1 : Reproduction du tableau 1 de l'enquête

1.1 Espèces	1.2 Total	1.3 Animaux provenant d'établissements d'élevage ou d'établissements fournisseurs agréés dans le pays auteur des statistiques	1.4 Animaux provenant d'autres sources dans l'UE	1.5 Animaux provenant d'États membres du Conseil de l'Europe et parties à la convention STE 123 (à l'exclusion des États membres de l'UE)	1.6 Autres provenances	1.7 Animaux réutilisés	1.8 Animaux génétique- ment modifiés
1.a Souris	760	705	55				38
1.b Rats	451	325	126				

De même, si l'établissement fournisseur pratique une opération (par exemple, une vasectomie), au sens de la directive 86/609/CEE, c'est une expérimentation. Ces animaux seront-ils comptabilisés par l'établissement fournisseur ou par l'EEA ?

Le cas des animaux transgéniques pose aussi un certain nombre de questions. Les animaux servant à générer des animaux d'expérience ne doivent pas être comptabilisés. Mais ils sont souvent marqués et on leur prélève un morceau de queue, opération qui peut être douloureuse...

Le tableau 2 de l'enquête donne le nombre d'animaux utilisés dans des expériences à des fins particulières. Le tableau 4 indique le nombre d'animaux utilisés dans des expériences pour l'étude des maladies humaines et animales. Si on recoupe les données entre les colonnes 2.2 (Études de biologie fondamentale) et 2.3 (Recherche et développement de produits et appareils utilisés en médecine et dentisterie humaines et en médecine vétérinaire [à l'exclusion des essais toxicologiques et autres évaluations de sécurité comptabilisées dans la colonne 2.6]) et celles de la colonne 4.7, on arrive à la conclusion que toutes les études de biologie fondamentale se ramènent à des études de maladies humaines et animales !

■ *Classification des données* : pour l'enquête 2007, presque tous les EEA ont rendu leurs chiffres sous forme numérique. Un certain nombre d'erreurs et d'incohérences ont ainsi été mises à jour par le logiciel. Le système doit encore être amélioré notamment par des notes de bas de pages, la tenue détaillée de registres entrées/sorties, etc. Il conviendrait d'ajouter une colonne pour animaux utilisés dans le cadre du règlement REACH. La notion d'animal d'expérimentation pourrait être revue (rôle de la CNEA). Le cas des animaux transgéniques doit être pris en considération (lors de l'adoption de la directive, ils n'existaient pas).

Le Ministère de la recherche a ajouté un tableau (n° 9) relatif au nombre d'animaux euthanasiés par des méthodes « humaines » aux fins de

prélèvements de cellules, tissus ou organes pour mettre en œuvre des études *in vitro*. Au sens de la directive le sacrifice de ces animaux ne constitue pas une expérience (Art. 2). Ne sont pas comptabilisés dans ce tableau les animaux pour expériences *in vivo*.

■ *Expression des résultats* : il apparaît que la collection des données n'est pas simple et que l'erreur est toujours possible. L'informatisation devrait permettre de limiter les biais possibles. Pour l'enquête 2007, il y a eu 399 répondants (sur 450). En 2004, il y avait eu 381 sur 434. Ces résultats conduisent à considérer une marge d'erreur que je pourrais estimer à 5 ou 10 % qui reste stable d'une enquête sur l'autre.

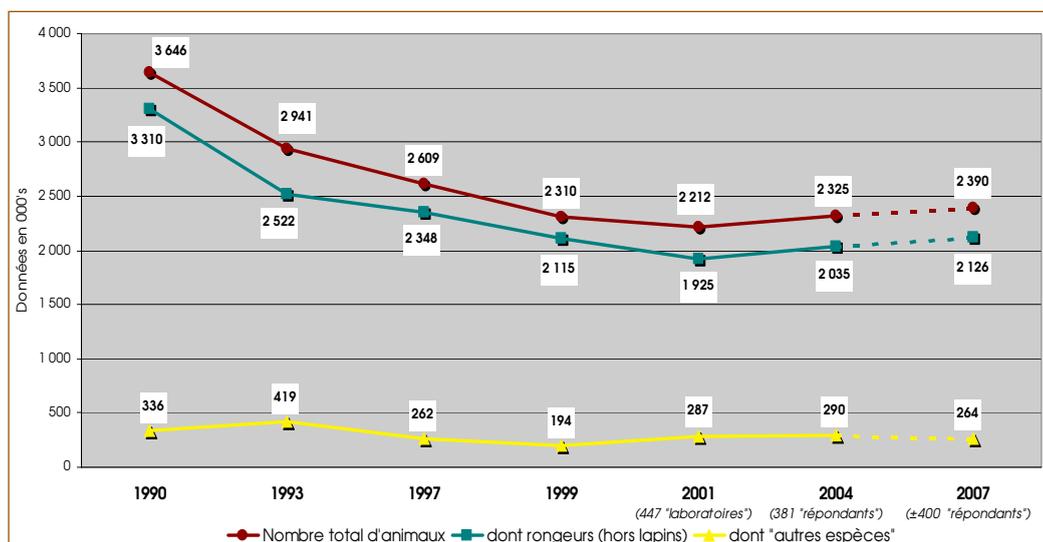
■ *Interprétation des évolutions du nombre d'animaux utilisés* : les premiers résultats de l'enquête 2007 (extrapolation à partir de données recueillies auprès de 183 EEA, 39 privés et 144 publics soit environ 50 % des EEA) permettent de donner une idée de l'évolution de l'utilisation des animaux d'expérimentation (cf. tableaux 2 et 3).

Tableau 2 : Résultats de l'enquête 2007

	2007	2004
Nombre total d'animaux utilisés	2,39 millions	2,32 millions
dont Rongeurs	2,13 millions	2,03 millions
Autres espèces	264 000	290 000

Ces résultats préliminaires montrent qu'il n'y a pas de réduction par rapport à 2004. Ils sont comparables aux chiffres européens. Mais il ne faut pas oublier qu'il convient de mettre en parallèle le nombre d'animaux utilisés et le volume des recherches médicales. ■

Tableau 3 : Evolution du nombre d'animaux utilisés en expérimentation en France



2 Harmonisation des réglementations et réduction du recours à l'animal de laboratoire

Yves Juillet

LEEM

Ex-membre du « Steering Committee » ICH

Le principal objectif des réglementations est la protection de la santé publique et du patient. Les questions de sécurité sont de plus en plus sensibles et elles augmentent le coût de la recherche et du développement.

L'harmonisation de la réglementation au niveau international doit répondre à ces objectifs tout en évitant la duplication des études et en rationalisant le type d'essais à réaliser avec, comme conséquence directe, la diminution de l'utilisation des animaux de laboratoire pour la partie préclinique du dossier.

Le processus ICH (International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use) qui regroupe les Autorités et les Entreprises du médicament d'Europe, des Etats-Unis et du Japon a conduit à une harmonisation presque complète du dossier toxicologique.

Pour les pays européens, l'autorisation de mise sur le marché se faisait déjà au niveau de l'Union européenne avec un seul dossier dans une seule langue et selon un même format.

Depuis 1990, les Autorités et les représentants de l'industrie pharmaceutique de l'Europe, des Etats-Unis et du Japon ont décidé d'harmoniser les procédures et ont abouti à l'adoption de « guidelines » harmonisés tripartites avec des études présentées selon un format harmonisé le CTD (Common Technical Document).

L'ICH est dirigé par un « Steering Committee, SC » qui est un organisme de décision aidé par des coordinateurs.

Un groupe de travail (Expert Working Group, EWG) est désigné pour la rédaction de chaque « guideline ».

Des groupes de suivi (Implementation Working Groups, IWG) peuvent être décidés pour assurer la mise en application d'un « guideline ».

L'adoption d'un « guideline » suit un processus établi :

- adoption consensuelle par le « Steering Committee » d'un projet et d'un plan d'action
- désignation d'un EWG avec un rapporteur chargé de mener le travail.

- Chaque « guideline » suit cinq étapes :
 - > Etape 1 : première rédaction
 - > Etape 2 : premier document consensuel adopté par l'EWG et le SC
 - > Etape 3 : consultation publique
 - > Etape 4 : adoption définitive par les autorités des trois régions (UE, USA, Japon)
 - > Etape 5 : publication dans les JO des trois régions

À ce jour, une cinquantaine de « guidelines » techniques ont été adoptés dont parmi eux :

- **Sur la sécurité expérimentale :**
 - > S1 A Need for carcinogenicity studies of pharmaceuticals
 - > S1 B Testing for carcinogenicity or pharmaceuticals
 - > S1 C (R2) Dose selection for carcinogenicity studies of pharmaceuticals
 - > S2 (R1) Genotoxicity : testing and data interpretation for pharmaceuticals
 - > S3 A Toxicokinetics : assessment of systemic exposure in toxicity studies
 - > S3 B Pharmacokinetics : repeated dose tissue distribution studies
 - > S4 Single dose toxicity tests
 - > S4 A Duration of chronic toxicity testing in animals
 - > S5 A (R2) Detection of toxicity to reproduction for medicinal products and toxicity to male fertility
 - > S6 Safety studies of biotechnological derived products
 - > S7 A Safety pharmacology studies
 - > S7 B Non clinical evaluation of potential QT interval prolongation
 - > S8 Immunotoxicity studies

- **Sur des questions d'ordre général multidisciplinaires :**

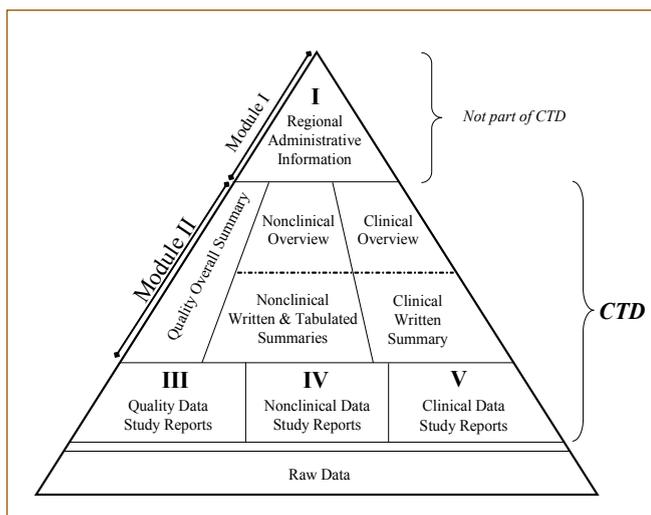
- > M1 Medical terminology (MedDRA)
- > M2 Electronic standards for the transfer of regulatory information and data (ESTRI)

- > M3 Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals
- > M4 Organisation of the CTD for the registration of pharmaceuticals for human use
- > M4 Q CTD Quality
- > M4 S CTD Safety
- > M4 E CTD Efficacy
- > M5 Data elements and standards for drug dictionaries

Note : la lettre R indique que le document a été révisé.

Le « Common Technical Document (CTD) est un format commun agréé par les trois régions. Il est organisé en module (cf. figure 1)

Figure 1 : Organisation d'un CTD



L'harmonisation est avancée mais il reste encore des inconsistances (toxicité aiguë, étude de toxicité avant la phase 1 y compris les études sur la reproduction).

Des sujets sont en cours de discussions assez ardues sur l'utilisation d'animaux juvéniles, de primates, d'animaux transgéniques.

L'évolution des connaissances scientifiques n'est prise en compte que tardivement. Cependant des initiatives sont en cours notamment dans le cadre d'IMI (Innovative Medicine Initiatives) sur des études de toxicité prédictive.

Ces « guidelines » sont révisés de façon périodique. La révision du guideline M3 est en cours de finalisation et va permettre une remise à plat de l'ensemble des études toxicologiques requises et entraîner une nouvelle rationalisation des études et en conséquence une diminution supplémentaire du recours aux animaux de laboratoire.

En ce moment la consultation publique (étape 3) de ce document est en cours et visible

sur le site www.ich.org. Il sera finalisé lors du Steering Committee de novembre 2008.

Les éléments révisés concernent les points suivants :

▪ **Etude de la toxicité aiguë :**

Il s'avère que les études spécifiques sont rarement nécessaires. Des informations suffisantes peuvent être obtenues grâce aux résultats des études toxicologiques à doses répétées. Elles doivent être recueillies avant les études cliniques de phase II et III.

▪ **Doses limites dans les études de toxicité :**

Les recommandations sont restées identiques à celles du premier guideline soit, si la dose chez l'homme est inférieure ou égale à 1 mg/j :

Pour les rongeurs : 2 000 mg/kg/j

Pour les non rongeurs 1 000 mg/kg/j

En ce qui concerne l'« exposition margin » elle doit être < ou = à X 50/dose maximum d'exposition à la dose recommandée chez l'homme (en pratique souvent plus)

▪ **Durée des études de toxicité répétée chez les non-rongeurs**

Actuellement la durée préconisée dans le guideline ICH est de 9 mois mais les Etats-Unis continuent à demander 12 mois.

Entre 1999 et 2006 une étude a été menée sur 150 produits au Japon, en Europe et aux Etats-Unis. Elle consistait à faire la comparaison entre des durées de 6 mois, 9 mois et 12 mois. Les résultats ont montré que :

- > 6 mois (surtout sur le chien) sont souvent suffisants mais pas toujours
- > 9 mois : aucune donnée n'a montré une durée insuffisante (pour les molécules chimiques)

Au final, un accord a été trouvé entre les trois parties pour retenir la durée de 9 mois et supprimer les études 12 mois sans exception.

▪ **Programme études précliniques permettant la réalisation des études cliniques**

Plusieurs approches ont été considérées en fonction des études envisagées :

- > Etudes microdoses :
 - Dose totale 100 mg
 - Dose totale 500 mg en 5 fois
- > Etudes doses uniques au maximum de la dose thérapeutique
- > Etudes doses multiples

Pour chaque cas clinique, la nature des études précliniques a été envisagée.

Clinique	Toxicité générale	Mutagenèse
Dose totale < 100 mg max 50 adm (AMM)	Etude tox dose unique dose limite 10 mg/kg rat	Habituellement non faite Etude réalisée jointe à la demande
Dose totale < 100 mg max 5 adm Wash out entre les doses	Et. tox 7 jours Rongeur avec tox cinétique Hémato Necropsie Doses idem	AR négative Pas étude mutagenèse
Dose unique Sub-thérapeutique ou thérapeutique	Etude dose unique chez rongeur Top dose MTD MFD ou dose limite	Test d'Ames ou équivalent
Clinique	Toxicité générale	Génétox
Dose répétée 14 jours sans étude dose max tolérée	Etude standard 2 semaines ron- geur et non-rongeur Sélection dose fonction AUC Clinique anticipée à la dose max	Test d'Ames ou équivalent et essai de clastogénèse

Tableau 4 : Exemples de relation doses/études

▪ **Etudes de mutagenèse**

Il est considéré qu'un essai de mutation génique est suffisant pour la réalisation de toutes les études cliniques dose unique. Pour les études multidoses, il est proposé un choix de deux batteries de tests telles que définies dans le guideline S2 (R1) (*Genotoxicity : testing and data interpretation for pharmaceuticals*)

▪ **Etudes de reproduction**

Il a été procédé à une étude rétrospective des données relatives à plusieurs centaines de composés développés dans diverses médications entre 1999 et 2006 aux Etats-Unis, au Japon et en Europe afin d'évaluer la capacité de ces études « dose-réponse » à prédire le résultat des essais à dose définitive fixés en termes de modification de décision clinique ou d'impact sur l'étiquetage.

Les résultats de cette étude montrent qu'il existe une bonne prédictivité lorsque les études dose-réponse sont disponibles et qu'il existe des examens des viscères et du squelette.

Aux Etats-Unis, on se heurte au refus de faire des études spécifiques sur la femme car c'est anti-constitutionnel. Cependant, un accord a été trouvé pour que des femmes en âge de procréer participent à des essais à condition qu'il n'y ait pas plus de trois mois d'exposition avant la finalisation des études « définitives » de toxicité reproductive et ceci avec contrôle de la maternité.

La FDA a donné son accord pour qu'il n'y ait pas d'études dose-réponse alors que le Japon et l'Europe demandent la finalisation des études de reproduction complète avant tout essai clinique chez la femme sauf si la durée d'exposition est courte (< ou = à 2 semaines) avec un contrôle intensif du risque de grossesse.

▪ **Etudes spéciales**

- > En pédiatrie : il est question de remettre en cause ou de limiter les études chez l'animal juvénile, de supprimer la deuxième étude en routine et même de discuter de l'utilité de la première étude.
- > Les études d'immunotoxicité seront à réaliser seulement avant la phase 3 clinique
- > Les études de photocarcinogénicité sont généralement sans valeur dans le développement pharmaceutique
- > Révision des études combinaisons fixes (une seule espèce) pas de nouvelles études de genotoxicité, de sécurité pharmacologique, ou de cancérogenèse si les produits ont été testés individuellement.
- > Potentiel d'addiction : il conviendra d'éviter de manière générale l'utilisation de primates en privilégiant l'utilisation de rongeurs à doses limitées.

Cette nouvelle harmonisation va conduire à une réduction et à une optimisation de l'utilisation des animaux de laboratoire.

En effet, les études de toxicité aiguë isolées seront définitivement éliminées. Les études à doses répétées auront des limites précises en matière de doses et de durée d'exposition. Enfin, les études de reproduction seront retardées permettant ainsi de les éviter pour les produits dont le développement clinique est arrêté précocement.

L'harmonisation des exigences en matière d'études précliniques et plus spécifiquement de toxicologie a déjà permis et va permettre encore plus, une réduction du nombre d'animaux utilisés, au-delà des différences encore observées entre les régions. ■

3 Impact des approches alternatives : Quelques exemples

Isabelle Fabre

AFSSAPS

Direction des Laboratoires et Contrôles - Montpellier

Depuis une vingtaine d'années, des progrès significatifs ont été réalisés pour l'amélioration du bien-être des animaux de laboratoire et le développement de méthodes visant à réduire ou remplacer l'expérimentation animale (3 R). Ainsi les réglementations encadrant la mise sur le marché des produits au sein de l'UE incitent à utiliser des stratégies permettant de réduire l'expérimentation animale (médicament, substances chimiques) ou mieux de l'interdire (produits cosmétiques).

Le cinquième rapport de la Commission européenne publié en 2007 indique que pour 25 Etats membres ont été utilisés 12,1 millions d'animaux dont environ 77,5 % de rongeurs.

Ces utilisations concernent pour 60 % la recherche médicale ou la R & D tandis que 15,3 % des animaux sont utilisés pour la production et les contrôles qualité des produits de santé.

L'utilisation des animaux peut se faire, soit dans un contexte non réglementaire (par exemple pour la recherche et le développement d'un médicament), soit dans un contexte réglementaire (tests requis par la réglementation et scientifiquement validés).

Dans le cadre de la sélection d'un candidat médicament, les industriels font de plus en plus appel à des modèles *in silico* et/ou *in vitro* pour la recherche de la cible thérapeutique, les études précoces de sécurité ou les études de métabolisme et de pharmacocinétique. Ils utilisent les données QSAR et/ou les outils moléculaires ou cellulaires pour les études de pharmacologie.

Par ailleurs, des directives européennes ou des réglementations internationales, soit interdisent (par exemple en cosmétique), soit réglementent l'utilisation des animaux de laboratoire tout en incitant à réduire leur nombre (harmonisation ICH). Celle-ci a permis d'éliminer le test de la toxicité anormale tandis que l'OCDE a préconisé l'abandon de la DL 50.

Le cas des diagnostics de grossesse est un exemple du remplacement des tests biologiques effectués notamment sur la lapine par des tests immunologiques (détection de la hCG), soit dans l'urine, soit dans le sang de la femme.

Un autre exemple de stratégies 3 R est illustré par les vaccins. En effet, de par leur nature biologique, la réglementation européenne impose que les essais de contrôle de la qualité réalisés par l'industriel pour la libération des lots de vaccins soient reconduits par un laboratoire officiel de contrôle (OMCL). Ces essais représentent actuellement environ 30% du nombre total d'animaux utilisés par le fabricant pour le développement et la mise sur le marché d'un vaccin.

L'utilisation des Bonnes Pratiques de Fabrication et de l'assurance qualité permet de faire les tests *in vivo* sur le produit final vrac plutôt que sur les lots.

La production d'un certain nombre de vaccins viraux se fait maintenant à partir de lignées cellulaires (tableau 5).

Tableau 5 : Production de vaccins viraux

Vaccins viraux	Méthodes de production anciennes	Méthodes de production actuelles (<i>in vitro</i>)
Poliomyélite	Culture primaire de rein de singe	Lignée cellulaire (e.g.VERO)
Rage	Jeunes lapins et souris	Lignée cellulaire
Grippe	Œuf de poule embryonné	Lignée cellulaire
Variole	Peau de veau	Lignée cellulaire

La mise en place d'un programme de standardisation biologique (BSP) sous l'égide du Conseil de l'Europe piloté par l'EDQM (European Directorate for the Quality of Medicine) a permis l'application du concept 3 R dans de nombreuses monographies de la Pharmacopée Européenne, par exemple :

- > Le test LAL en remplacement du test pyrogène sur le lapin,
- > Le test de toxicité anormale supprimé pour la plupart des vaccins,
- > Le dosage des antigènes *in vitro* dans le vaccin (Hépatite A, « Newcastle disease »),
- > Le test de challenge remplacé par le dosage sérologique des anticorps spécifiques.

Par ailleurs, la mise en œuvre de programmes statistiques a permis de réduire de manière significative les tests *in vivo* réalisés par les OMCL :

- > Approche « reducing » : seulement 20% de lots sont contrôlés par l'OMCL si la preuve de la reproductibilité de la qualité de 20 lots successifs est apportée par le fabricant (80% de réduction du nombre d'animaux).
- > Approche « monodose » : essai réalisé avec une seule dose de vaccin au lieu de 3 ou 4 doses (60 à 80% de réduction du nombre d'animaux).

Les vaccins sont soumis à des tests de contrôle qualité relatifs à la sécurité et à l'efficacité. Les tableaux suivants donnent des exemples d'alternatives à l'utilisation de l'animal pour effectuer ces tests.

Vaccins	Tests de sécurité	Modèle animal	Alternative	3 R	Statut pharmacopée européenne
Vaccins humains	Toxicité anormale	Souris et cochon d'Inde	Suppression des tests	Remplacement	Accepté sous condition de régularité de production
Diphthérie	Toxicité résiduelle	Cochon d'Inde (intradermique)	Test cellules VERO	Remplacement	Accepté
Coqueluche	Gain de poids	Souris	Nombre d'animaux	Réduction	Accepté
Polio oral	Neurovirulence	Singe (intracérébral)	Souris transgéniques Méthodes PCR (MAPREC)	Raffinement Remplacement	a et b en cours de validation
Vaccins vétérinaires	Test sécurité générale : espèce cible	Animal cible	Suppression des tests	Remplacement	Accepté sous condition de régularité de production de 10 lots consécutifs
Vaccins aviaires	Virus adventices	Poulet	Culture cellulaire	Remplacement	Accepté

Tableau 6 : Application de la règle des 3 R dans les tests de sécurité

Vaccins	Tests de sécurité	Modèle animal	Alternative	3 R	Statut pharmacopée européenne
Tous	Test de challenge avec des signes cliniques graves		Points limites	Raffinement	Accepté
Tétanos	Test de challenge létal avec paralysie	Souris, cochon d'Inde	Sérologique/ challenge	Raffinement et réduction	Accepté
Diphthérie	Test de challenge létal intradermique	Cochon d'Inde	Sérologique/ challenge	Raffinement et réduction	Accepté
Tétanos/ Diphthérie	Test sérologique	Cochon d'Inde	Dose unique	Réduction	Accepté
Hépatite B et A	Test sérologique	Souris	Dosage d'antigènes	Remplacement	Accepté après validation
Poliomyélite (inactivé)	Test sérologique	Rat	Dosage d'antigènes	Remplacement	Accepté après validation
LRage	Test de challenge létal	Souris	Une seule dilution	Réduction	Accepté
Erysipelas	Test de challenge létal	Souris	Sérologie	Raffinement et réduction	Accepté
Canine leptospiral (non-adjuvanted)	Test de challenge létal	Hamster	Dosage d'anti-gènes	Remplacement	Accepté après validation
Clostridial novyi (type B) perfringens/septicum	Test de neutralisation de toxine	Lapin / Souris	Sérologique/ challenge	Raffinement et réduction	Accepté
Newcastle disease	Test de challenge létal	Poulet	Dosage d'antigènes	Remplacement	Accepté après validation

Tableau 7 : Application de la règle des 3 R dans les tests d'efficacité

L'application de la règle des 3 R aux contrôles qualité des vaccins a permis de réduire de manière significative le nombre d'expériences *in vivo*.

L'étude des modifications et des nouvelles monographies de la Pharmacopée européenne entre 1988 et 2007 montrent la prise en compte de plus en plus importante des 3 R comme le montre le tableau suivant :

	Nombre de monographies 3 R	Type de R	Nature
Antibiotiques	≈ 56	Remplacement	Délétion test sécurité Remplacement pyrogène/LAL
Biotechnologies	≈ 47	Remplacement	Délétion test sécurité Remplacement pyrogène/LAL Remplacement bioessais par HPLC
Produits sanguins	≈ 21	Remplacement	Délétion toxicité anormale
Vaccins humains	≈ 178	35 % remplacement 49 % réduction 16 % raffinement	Méthodes <i>in vitro</i> « Reducing » Monodoses vs multidoses
Vaccins vétérinaires	≈ 102	13 % remplacement 78 % réduction 9 % raffinement	Suppression tests sécurité Batch release routine

Tableau 8 : Monographies 3 R

L'utilisation des méthodes 3 R présente encore des obstacles pour le fabricant et les laboratoires de contrôle tant sur des aspects pratiques que sur des aspects réglementaires.

Pour les aspects pratiques, il faut tenir compte du coût et de la disponibilité des réactifs, de la validation interne de la méthode, (corrélations *in vivo/in vitro* pour, par exemple, les vaccins antibactériens), la formation du personnel, des équipements et du temps nécessaire.

Concernant les aspects réglementaires, les méthodes 3 R doivent bénéficier d'une reconnaissance internationale par les organismes tels que la FDA, l'OMS, etc. Par exemple, la toxicité anormale est encore utilisée car exigée par l'OMS, la FDA, la Russie, la Chine et Taïwan. Par ailleurs, il existe une inadéquation entre la durée de validation et la durée de vie du produit.

Comme il vient de l'être démontré, les vaccins présentent un fort potentiel de réduction. En effet, les nouveaux vaccins présentent une plus grande régularité de production. Les nouvelles méthodes

d'analyses (physicochimiques, exploration non invasive) sont de plus en plus performantes. Les collaborations entre l'OMS /EDQM/ICH conduisent à une harmonisation internationale. Les relations entre les organismes de contrôle et les industriels se développent. Les processus de validation et d'adoption réglementaire des méthodes alternatives doivent être accélérés

Enfin, suite aux adoptions du règlement REACH et du 7^e amendement de la directive cosmétique, les partenariats européens (ECOPA, EPAA) peuvent faire pression pour accélérer les validations. Les collaborations entre les différents organismes (ICH, OMS, OCDE) vont permettre d'identifier les cibles à fort potentiel de réduction, de favoriser le partage des données et des méthodes. Il convient également de prendre en compte les nouvelles technologies (OMICS, modèles cellulaires, peptide « binding », *in silico*, physico-chimiques, imagerie) pour compléter les moyens à mettre en œuvre pour réduire au maximum le recours à l'animal de laboratoire. ■

4 Les enjeux de l'imagerie non invasive du petit animal

Corinne Laplace-Builhé

Institut Gustave Roussy, Villejuif

Plate-forme d'imagerie cellulaire et cytométrie

Les modèles animaux sont devenus des outils indispensables pour élucider les mécanismes biologiques dans des conditions normales et pathologiques et sont un pré-requis pour le développement de nouveaux outils de diagnostic et de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce contexte, les petits rongeurs ont un réel intérêt puisqu'ils peuvent être manipulés génétiquement et servir de modèles « humanisés » pour certaines pathologies.

Les techniques d'imagerie non invasives sont également devenues incontournables pour caractériser et étudier de tels modèles, en particulier grâce à la réduction progressive de leur caractère invasif (meilleure définition de l'image, dose de rayonnement moindre, réalité augmentée d'une information virtuelle sur les organes ciblés, etc.).

Ces nouvelles techniques non invasives ne sont pas seulement développées dans un but éthique mais elles sont également liées aux enjeux économiques du développement des outils thérapeutiques. En effet, la mise sur le marché de nouvelles thérapeutiques a un coût estimé à 800 M \$ et nécessite 12 ans de développement. Seulement 5 molécules sur 5 000 évaluées en préclinique sont testées sur l'homme et 1 seul composé sur 5 testés sur l'homme est finalement approuvé.

On constate ainsi une évolution très rapide des applications de l'imagerie du petit animal qui permettent d'observer avec un œil nouveau des phénomènes dynamiques, révélant des phénomènes difficilement visualisables jusqu'à présent, chez l'animal vivant.

Cette nouvelle génération d'imagerie est particulièrement recherchée pour élucider des questions fondamentales biomédicales telles que les voies métaboliques impliquées dans les processus pathologiques, pour évaluer l'évolution et l'extension de la maladie et pour faciliter et accélérer le développement des agents thérapeutiques (efficacité, absorption, distribution, métabolisation, élimination, toxicité, etc.).

Ces techniques doivent cependant être conçues pour limiter la variabilité et améliorer la reproductibilité. Chaque animal est donc son propre contrôle et la variabilité inter individus est évaluée longitudinalement.

Le tableau 9 (adapté d'après Bechmann *et al.*, NMR Biomed. 2007 ; 20 : 154-155) présente les différentes modalités d'imagerie du petit animal.

Tableau 9 : Modalités d'imagerie du petit animal

Technique	Résolution spatiale / durée d'acquisition	Imagerie clinique	Applications	Spécificités
Echographie	50 µm/min	Oui	Anatomique, fonctionnelle	Imagerie des tissus mous (difficulté à imager à travers l'os ou les poumons)
CT	50-100µm/min	Oui	Anatomique, fonctionnelle	Faible contraste des tissus mous
IRM	80-100 µm/min	Oui	Anatomique, fonctionnelle, moléculaire	Haute résolution spatiale et excellent contraste des tissus mous
SPECT	1 à 2 mm/min	Oui	Fonctionnelle	Sensibilité 10 à 100 fois inférieure au PET
PET	1 à 2 mm/min	Oui	Métabolique, fonctionnelle, moléculaire	Haute sensibilité (picomolaire) Cyclotron nécessaire
Bioluminescence	1 à 10 mm/s à min	Non	Métabolique, fonctionnelle, moléculaire	Haute sensibilité (nano à picoM) utilisation de transgène
Fluorescence « visible »	0,2 à 500 µ/s	Oui	Métabolique, fonctionnelle, moléculaire	Haute sensibilité (et haute résolution) Indications limitées en clinique Atténuation du signal en profondeur des tissus
Fluorescence proche infra-rouge	1 à 2 mm/min	Non	Métabolique, fonctionnelle, moléculaire	Haute sensibilité. Atténuation du signal en profondeur des tissus

L'imagerie fonctionnelle peut être réalisée soit à l'échelle de l'organe et de la cellule soit à l'échelle cellulaire et moléculaire grâce à de nouvelles sondes intelligentes, capables de cibler spécifiquement des compartiments et des activités cellulaires.

Ainsi, de nouvelles stratégies d'imagerie des cibles thérapeutiques ont été développées pour la fluorescence :

- > *ciblage spécifique* : Intégrine $\alpha v \beta 3$: molécule d'adhésion cellulaire impliquée dans l'angiogénèse et les événements métastatiques dans de nombreux types de tumeurs. Molécule surexprimée dans les cellules endothéliales activées et dans les tumeurs solides à croissance rapide.
- > *activité fonctionnelle* : Cathepsines (endopeptidases à site actif cystéine). Enzymes lysosomales, actives à pH acide. Dans les tumeurs, elles sont impliquées dans la dégradation du collagène et de l'élastine et dans l'initiation des métastases et dans l'apoptose. Le niveau de Cathepsine B a été corrélé avec le degré de malignité et est utilisé pour évaluer la progression tumorale.

Cependant, aucune modalité d'imagerie ne réunit individuellement les critères optimaux de sensibilité, de spécificité et de résolution spatio-temporelle. Par exemple, l'IRM « conventionnelle » présente une faible sensibilité pour la détection de processus moléculaires. Mais elle présente une haute résolution spatiale et sera une bonne référence anatomique pour les informations moléculaires acquises avec d'autres modalités ayant une haute sensibilité.

Il est donc important de considérer une approche multimodalités en imagerie du petit animal prenant en compte l'interdépendance entre les structures anatomiques et les informations moléculaires et fonctionnelles. Par exemple, pour évaluer *in vivo* la cinétique de croissance d'un modèle métastatique de neuroblastome, on peut utiliser l'échographie de contraste et la bioluminescence. L'association de ces deux techniques permettra une caractérisation *in situ* du développement tumoral, la bioluminescence étant plus adaptée à la

détection des métastases et l'échographie de contraste permettant une caractérisation des modifications de la perfusion au cours du développement tumoral via des paramètres plus directement reliés à la physiopathologie des tumeurs.

Pour le traitement des données obtenues, lors de sessions d'imagerie multimodalités telles que PET-IRM, PET-CT ou Ultra-son-IRM, il faut faire appel à des développements de logiciels sophistiqués pour la fusion des images pouvant être acquises à des échelles différentes. Enfin, ces données doivent pouvoir être traduites en information biologique.

L'imagerie du petit animal reste un véritable challenge technologique car les dimensions restreintes de ces modèles animaux implique d'améliorer :

- > l'exploration des données fonctionnelles fournies par les techniques d'imagerie,
- > la sensibilité des instruments afin d'exploiter complètement l'intérêt de l'imagerie des modèles animaux.

Aujourd'hui, il existe peu d'exemples d'utilisation des informations d'imagerie permettant de faciliter la translation de la souris à l'homme parce que, notamment, les outils utilisés pour imager le petit animal ne sont pas standardisés, ni correctement validés ni quantitatifs. Les sondes utilisées n'ont pas reçu l'approbation des instances réglementaires. La souris est un modèle pour l'humain mais n'est pas un humain : la réponse à un traitement peut dépendre de la lignée animale (*Sauter and Rudin, 1998*).

Le prochain challenge sera donc de réussir ce transfert vers l'homme pour le suivi clinique des patients, pour optimiser les doses et pour documenter l'efficacité des traitements qui ont été développés lors des études sur le petit animal. Par ailleurs, ces techniques d'imagerie requièrent une grande pluridisciplinarité et une fédération des connaissances et des savoir-faire, qui seules combinées pourront assurer le transfert réussi de ces outils à la clinique. ■

5 Maîtrise des facteurs environnementaux et validité des résultats expérimentaux

Annie Reber
Université de Rouen

Tout chercheur souhaiterait ne pas avoir à utiliser les animaux pour mener ses recherches scientifiques ou biomédicales. Il y est pourtant contraint au moins dans certaines étapes de son programme de recherche. En effet, les méthodes alternatives ou substitutives ne permettent pas de reproduire la parfaite complexité du vivant, d'autant que certains paramètres des systèmes vivants sont encore inconnus.

Cependant, le chercheur adopte une démarche éthique fondée sur le principe du respect de l'animal qui le conduit à :

- > réduire le recours à l'animal de laboratoire et le nombre d'animaux utilisés,
- > raffiner les expériences, les protocoles et les procédures,
- > remplacer l'expérimentation *in vivo* par des méthodes alternatives ou substitutives.

Pour bâtir de nouveaux projets sans avoir à reproduire des expériences déjà faites, le chercheur doit pouvoir réutiliser des résultats antérieurs ou fournis par d'autres laboratoires. La seule condition est que les résultats sur lesquels le chercheur s'appuie soient fiables et donc reproductibles aussi bien :

- > dans l'instant, lors d'une série d'expériences dans le laboratoire,
- > dans l'espace, donc dans des laboratoires éloignés, la recherche n'ayant pas de frontière,
- > dans la durée, en utilisant des résultats antérieurs pour projeter de nouvelles recherches.

La reproductibilité des résultats contribue à réduire le nombre d'animaux utilisés. Elle signifie qu'une « même cause produise le même effet dans les mêmes conditions ».

Idéalement, les conditions environnementales devraient être identiques, ou être maîtrisées pour varier le moins possible au cours du temps ou d'un laboratoire à l'autre.

L'environnement de l'animal de laboratoire est composé de :

- > son environnement interne qui est son milieu intérieur,

> son environnement externe qui est de deux types :

- primaire, c'est à dire la cage et son contenu inerte et vivant,
- secondaire, c'est à dire l'animalerie ainsi que les paramètres physiques de l'environnement, le personnel et les autres animaux.

> son environnement indirect au-delà de l'animalerie.

Ces conditions environnementales ont été harmonisées en 1986. Un environnement standard a été pris comme référence. Il est défini dans l'annexe II de la directive européenne 86/609/EEC modifiée qui tient compte des recommandations de l'annexe A de la Convention STE 123 de 1986.

La plus grande maîtrise des facteurs environnementaux n'empêche cependant pas que les résultats présentent des différences, reflet de la variabilité interindividuelle. Cette variabilité interindividuelle résulte des caractéristiques de chaque individu : son patrimoine génétique, son interaction avec l'environnement et son expérience. Les valeurs d'un paramètre en biologie sont souvent distribuées selon une courbe de Gauss caractérisée par sa dispersion (évaluée par l'écart type : σ) autour de la moyenne. Quand les conditions expérimentales n'introduisent pas de biais dans les résultats, les valeurs obtenues sur un échantillon d'animaux relativement faible permettent d'estimer la distribution des valeurs de la population, qui reste inconnue faute de pouvoir étudier tous les animaux.

Actuellement il est recommandé de rendre l'environnement direct de l'animal plus complexe. Cet environnement dit « enrichi » est supposé procurer plus de bien-être aux animaux, comme le souligne une phrase de l'annexe A révisée de la Convention STE 123 (introduction § 6) : « l'enrichissement est un facteur important du bien-être des animaux ». Le terme « bien-être » traduit le terme « welfare ».

Pour tenter de comprendre l'évolution des mentalités qui a conduit à cette situation, il convient :

- > de définir « enrichissement de l'environnement »,
- > de définir « bien-être »,
- > d'étudier les dates d'apparition du terme « bien-être » dans les publications et la législation.

● *L'enrichissement de l'environnement*

Le terme « **enrichissement de l'environnement** » a été utilisé la première fois en 1925 par Robert Yerkes comme « *les systèmes et installations offrant aux primates en captivité la possibilité de jouer et travailler* ». L'activité de l'animal est prise en compte.

En 1995, Newberry le définit comme « *l'amélioration du **fonctionnement biologique** d'un animal en captivité par les modifications de son environnement* ». La biologie de l'animal est prise en compte.

Shepherdson (1998) le définit comme « *un système dynamique de changement de structures permettant d'accroître le choix comportemental caractéristique de l'espèce pour améliorer son bien-être (« welfare »)* ». L'état de l'animal est pris en compte.

● *Le « bien-être de l'animal »*

En anglais, deux termes existent : « welfare » et « well-being ».

« **Welfare** » se réfère à la responsabilité de l'homme qui a le devoir de faire bien en particulier pour satisfaire ou faire prospérer, ou améliorer une situation dans un groupe (dictionnaire Merriam Webster, 2000).

Ce terme n'a pas d'équivalent en français. Claude Milhaud propose de le traduire par « bien-traitance » (2006). Pour le moment ce terme n'est pas repris dans la législation.

« **Well-being** » se réfère à la condition de l'animal. Se sent-il bien ? Ce terme correspond au terme français « bien-être » dont la définition du Littré est : « Etat du corps ou de l'esprit dans lequel on se sent bien ».

Pourtant en anglais courant, les deux mots semblent interchangeable. Dans la législation, les deux termes existent.

● *Evolution des termes « bien-être » dans les publications et la législation*

Le tableau ci-contre montre le nombre de publications par an, de 1965 à 2005, utilisant le mot clé « welfare » ou « well-being ». Les recherches sur le « welfare » se développent à par-

tir de 1984 et sur le « well-being » à partir de 2005.

Les travaux sur le « welfare » se multiplient intensément vers 1984. Il n'y a rien d'étonnant : les instances européennes préparent la convention et la directive qui font usage de ces termes. Les USA préparent les deux amendements de la loi américaine « animal welfare act ».

« Welfare » est le concept le plus facile à appréhender donc à étudier. Il est étudié d'abord. Le « bien-être » ou « well-being » n'est pas connu de nous, mais seulement estimé par la valeur de paramètres physiologiques ou comportementaux. Son étude reste encore peu abondante.

Trois questions se posent alors :

- > Y a-t-il un impact de l'environnement enrichi sur les résultats scientifiques ?
- > Y a-t-il un lien entre environnement enrichi et bien-être ?
- > Sans étude scientifique préalable, peut-on avoir la certitude de l'impact positif de l'enrichissement sur le bien-être animal ?

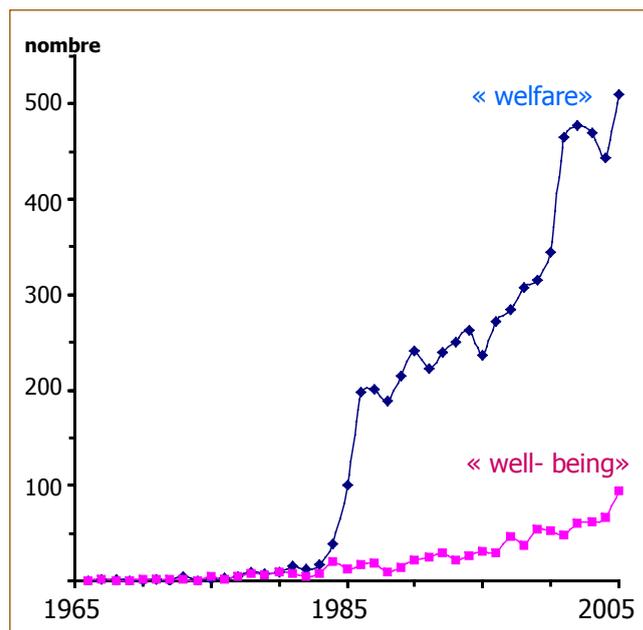
● *Y a-t-il un impact de l'environnement enrichi sur les résultats scientifiques ?*

Deux exemples parmi les enrichissements les plus communs permettent d'apporter des éléments de réponse.

L'enrichissement consiste souvent en une cage plus grande que le standard avec des objets et du matériel de nidification.

Dans l'exemple présenté (Coq et Xerri, 1996), il est constitué par 2 grandes cages reliées entre

Tableau 10: Evolution du nombre de publications utilisant les termes « welfare » et « well-being »



elles par 2 tunnels et contenant des objets de forme, de taille et de texture variées. Ils sont renouvelés tous les jours.

Le but est de comparer la sensibilité tactile chez des rats femelles *long Evans* élevées de 3 semaines à 3 mois dans ce milieu enrichi ou dans un milieu standard. Les femelles sont à 3 par cage. À la fin de cette période, les champs récepteurs des zones glabres de la paume et des doigts de la patte antérieure ont une taille réduite mais sont plus nombreux chez les animaux de milieu enrichi. Le cortex somato-sensoriel primaire correspondant est 1,40 fois plus étendu avec d'avantage de zones représentées. Ce résultat indique que ces animaux ont acquis une plus grande discrimination tactile que les rats du milieu standard. Y a-t-il un effet de réduction des zones corticales voisines ? L'augmentation de l'acuité tactile n'est pas spécifique au rat, elle est connue chez l'homme aveugle.

Un autre type d'enrichissement est constitué par des roues pour faire tourner les rongeurs. En faisant tourner les rats sur un manège toujours dans la même direction 1 heure par jour pendant 9 jours, nous observons une asymétrie fonctionnelle d'une structure visuelle, les colliculi : le gauche non stimulé par la rotation vers la droite est déprimé en AchE (Acetylcholinestérase), enzyme qui pourrait moduler la sensibilité des neurones.

Ces deux exemples montrent bien l'impact de l'environnement sur les résultats scientifiques tels que la plasticité du système nerveux.

● *Y a-t-il un lien entre « environnement enrichi » et « bien-être » ?*

Les deux exemples suivants apportent des informations.

Souvent, les objets servant à enrichir les cages de rats sont de couleurs variées. Il y en a des jaunes, des rouges des bleus des verts et de surcroît ils sont souvent brillants. Pourtant, nous savons que « la nuit tous les chats sont gris ». Cette vision en gris du monde est vraie pour l'homme autant que pour les animaux crépusculaires ou nocturnes, les rats, les souris. Mais eux, contrairement à l'homme ne voient jamais les couleurs, même en plein jour. Le rat ne voit pas les couleurs sauf peut être le vert mais faiblement. On peut se demander quel est l'intérêt de mettre des objets de couleur dans les cages ?

Cet exemple montre que l'environnement enrichi choisi paraît inadapté.

Un autre exemple est de vouloir offrir aux animaux un habitat plus grand. Les animaux à l'instinct grégaire sont toujours regroupés. Les rats

Dark agouti s'entassent même pour faire la sieste avec un veilleur au sommet de la pyramide. Seuls les rats âgés vivent et dorment seuls dans un coin.

On peut se demander si l'augmentation de taille des cages est réellement source de « bien-être » pour les animaux à instinct grégaire ? L'est-elle au moins à certains âges, pour certaines souches ?

Le matériel de nidification paraît être l'enrichissement le plus adapté au caractère fouisseur ou nidificateur des rongeurs.

Tous ces exemples montrent combien l'homme fait de l'anthropomorphisme, à tel point qu'il oublie les caractéristiques fonctionnelles d'un animal de laboratoire pour lui prêter les siennes.

Le danger est que des stimulations inadaptées altèrent le bien-être.

Si nous connaissons le « bien-être » de l'animal, commettrions-nous ces erreurs ? Nous ne le connaissons pas et n'en avons qu'une estimation par la mesure de paramètres physiologiques ou comportementaux

Les questions à résoudre sont :

- > Connait-on le bien-être d'une espèce, d'une souche ?
- > Est-il différent de celui du type « sauvage » ?

● *Sans étude scientifique préalable, peut-on avoir la certitude de l'impact positif de l'enrichissement sur le bien-être animal ?*

L'augmentation de la taille des cages a-t-elle un impact positif sur le bien-être de l'animal ? Il n'est pas possible de le dire car les études présentées dans les publications font varier plusieurs paramètres à la fois. Les résultats ne sont donc pas concluants.

Par contre, le protocole suivant peut répondre à cette question. Il fait varier un seul paramètre qui est la taille des cages, c'est-à-dire la surface du fond des cages. Pour comparer l'effet de deux surfaces de cages différentes, on compare une grande cage (conforme aux nouvelles normes, et une petite cage correspondant aux normes actuelles. On sélectionne deux espèces de rongeurs (rats et souris), des souches non consanguines (1 souche par espèce) et des souches consanguines (3 souches par espèce), on choisit de faire des tests sur des mâles, sur des femelles et sur un groupe social de mâles et femelles (3 groupes au total). L'âge des animaux au moment de l'incorporation dans les protocoles est de 3 semaines pour les animaux sevrés (mâles et femelles) et de 10 semaines pour les reproducteurs (mâles et femelles). Il y a au

total 24 groupes d'études par type de cage, donc pour les deux types de cages testés il y a 48 groupes d'études au total !

Reste à déterminer le nombre d'animaux par cage et le nombre de cages par groupe.

Catégories d'animaux	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
I - Souris non consanguines (NC - SWISS)	Mâles	Femelles	Mâles + Femelles (Reproduction)
II - Rats non consanguins (NC - WISTAR)	Mâles	Femelles	Mâles + Femelles (Reproduction)
III - Souris consanguines (C) 3 souches {C ₁ : DBA/1J {C ₂ : C57BL6/J {C ₃ : SJL/J	Mâles	Femelles	Mâles + Femelles (Reproduction)
IV - Rats consanguins (C) 3 souches {C ₁ : BN (Brown norway) {C ₂ : LEWIS {C ₃ : DA (Dark Agouti)	Mâles 9 semaines d'étude	Femelles 9 semaines d'étude	Mâles + Femelles (Reproduction) 16 semaines de reproduction

I et II : 3 groupes d'études = 24 groupes d'études
III et IV : 9 groupes d'études

Tableau 11 : Récapitulatif du protocole à envisager

Il faut ajouter que la statistique est un outil très précieux pour tirer parti de réponses hétérogènes et d'un nombre d'animaux réduit.

Par exemple, pour rechercher l'effet bénéfique d'un environnement enrichi, l'idéal est d'éliminer les variations interindividuelles en utilisant une méthode statistique adaptée où chaque animal est son propre témoin : la comparaison se fait entre le stade contrôle et le stade enrichi de chaque animal, ce qui élimine toute interférence possible entre l'effet de l'enrichissement et la variabilité naturelle interindividuelle. Deux types de tests présentent cet avantage :

- > un test non paramétrique classique basé sur la comparaison des réponses d'un même animal au stade non enrichi et au stade enrichi. Chaque animal est ainsi son propre contrôle.
- > un modèle bayésien permettant d'estimer l'effet global de l'enrichissement à partir des données contrôles de chaque animal. L'enrichissement qui a un effet est une variable aléatoire dont on peut établir la distribution *a priori* à partir de la distribution obtenue pour chaque animal.

Le but est de répondre à deux questions :

- > L'environnement améliore-t-il les conditions de l'animal ?
- > Ces conditions diffèrent-elles des conditions standard ?

Conclusion : Maîtrise des paramètres environnementaux

Les méthodes d'enrichissement devraient répondre à trois critères :

- > être judicieusement choisies pour ne pas introduire de biais dans les résultats
- > être répétables et reproductibles pour la validité des résultats
- > correspondre aux besoins spécifiques des animaux de laboratoire pour concourir à leur bien-être.

Il ne s'agit donc pas de confondre, lors de notre démarche éthique : « enrichissement » et « bien-être », et lors de notre démarche scientifique « modification de l'environnement » et « modifications fonctionnelles » dues à la plasticité du vivant.

Ces démarches sont complémentaires. Elles sont nécessaires pour atteindre l'objectif fixé : réduire le nombre d'animaux utilisés, concourir à leur bien-être tout en ayant des résultats scientifiques de qualité, fiables et reproductibles. ■

Remerciements : Drs Monique Pressac, Françoise Raynaud, Joseph-Paul Beaufays, Jean-Claude Desfontis, Robert Leblanc, Jacques Servièrè.

Bibliographie : Coq JO and Xerri C, *Environmental enrichment alters organizational feature of the forepaw representation in the primary somatosensory cortex of adult rats.*, Exp Brain Res. 121, 191-204 (1996).

6 La génomique et ses applications

Robert Barouki

Université Paris Descartes

Les progrès de la biologie moléculaire et de la génétique ont marqué le dernier tiers du siècle passé. Ils ont révolutionné les connaissances fondamentales en biologie et ont eu des répercussions pratiques dans de nombreux domaines. Les programmes sur les génomes (humain ou autres) ont rendu disponibles de très nombreuses informations. De nouveaux outils ont été développés (puces, spectrométrie) qui ont permis des études à grande échelle sur des organismes modèles ou sur l'homme.

Les techniques d'analyse de la structure et de l'expression des gènes à haut débit sont à présent très utilisées : la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique permettent d'étudier à grande échelle les différents composants de la cellule et de l'organisme. Ces nouvelles techniques s'articulent selon le schéma suivant :

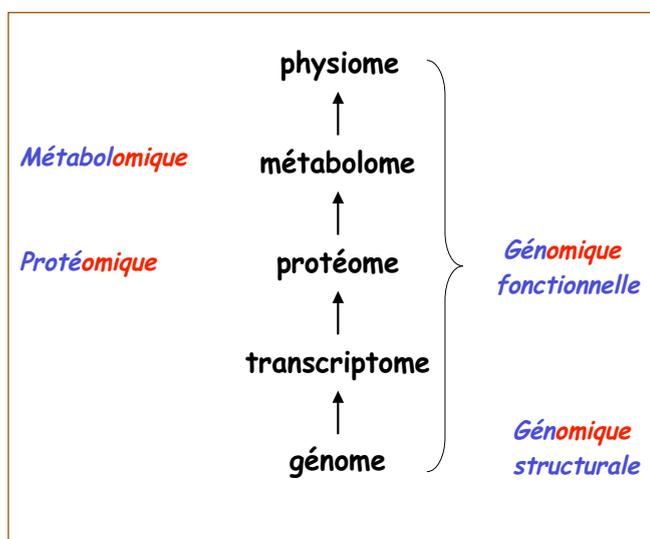


Schéma 1 : Articulation des nouvelles techniques

La génomique est l'étude à grande échelle de la structure et de la fonction des gènes tant sous un aspect structural (structure du génome, mutations, délétions, translocations, etc.) que sous un aspect fonctionnel, c'est-à-dire l'expression du génome caractéristique d'une cellule à un temps donné et dans des conditions données.

La génétique permet de comprendre que certaines pathologies peuvent être dues à des altérations de la structure du génome, d'expliquer les nombreux polymorphismes, les susceptibilités individuelles. Elle permet également l'étude des altérations génétiques à grande échelle.

Le nombre de gènes d'un organisme n'explique pas la complexité. La génomique fonctionnelle étudiera l'épigénétique et la régulation des gènes, l'épissage des ARNm et leur dégradation. La protéomique étudiera la stabilité des protéines, la régulation post traductionnelle et les interactions protéine-protéine. La métabolomique s'intéressera aux réseaux de voies métaboliques et à la biologie des systèmes.

On dispose actuellement de différents outils : puces à ADN (biopuces) de deux types (synthèse *in situ* ou dépôt), RT-PCR quantitative en temps réel.

Différentes méthodes sont utilisées en protéomique :

- > gels 2 dimensions/spectrométrie de masse,
- > chromatographie liquide (nano-LC) suivie d'analyse par MS/MS qui permet l'identification précise des protéines,
- > puces à protéines suivies de spectrométrie de masse de type Seldi TOP (« CIPHERGEN ») : séparation des protéines sur barrettes puis détermination d'un profil protéique. Cette technique ne permet pas l'identification précise des pics mais elle permet de séparer des centaines de pics par exemple dans un sérum,
- > puces à protéines (dépôts d'anticorps, de ligands, etc.).

Ces techniques ont des applications en recherche fondamentale. Elles permettent de suivre l'évolution globale de l'expression des gènes (cycle cellulaire, développement, vieillissement) sur différents types de modèles (levure, cellules en culture, souris, homme). Elles permettent d'étudier les corrélations entre une altération structurale (KO) et l'expression des gènes, les réseaux de gènes, les interactions protéiques et la structuration fonctionnelle de la cellule.

Différentes disciplines profitent des avancées des différentes techniques en omiques notamment la toxicologie qui a pour objectif de rechercher les mécanismes d'action expliquant les effets toxiques, d'identifier de nouveaux biomarqueurs et, à terme, de proposer des systèmes prédictifs de la toxicité d'un composé chimique ou d'un agent potentiellement nocif.

L'exposition à un xénobiotique conduit à un stress (physique, physiologique, etc.) qui est une réponse adaptative (situation aiguë) et peut s'accompagner de toxicité (chronocité). Ce stress peut être de nature de déficit ou au contraire d'excès.

L'utilisation des nouvelles techniques haut débit est pleinement justifiée puisque d'une part de nombreux toxiques modifient considérablement l'expression des gènes par l'intermédiaire de récepteurs bien identifiés et, d'autre part, certains toxiques ciblent directement l'ADN et les protéines.

La génomique fonctionnelle montre que le stress d'exposition aux xénobiotiques peut induire plusieurs types de réponses :

- > une réponse spécifique adaptative : métabolisme des xénobiotiques,
- > une réponse générale adaptative : contrôle du cycle cellulaire, apoptose,
- > autres réponses : métabolisme endogène, migration.

Chacune de ces réponses peut conduire à une toxicité.

Par exemple, la génomique a montré que la dioxine contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes. Certains sont impliqués dans la mobilité cellulaire : HEF-1, Sos-1, serpin-1, MKP, etc. Dans *C. elegans*, le récepteur AhR est impliqué dans la mobilité et la différenciation neuronale ; chez la drosophile *spineless*, il est impliqué au cours du développement. Certains mécanismes de toxicité de la dioxine sont mal compris. La transition épithélio-mésenchymateuse joue des rôles physiologiques et pathologiques importants. Peut-on en déduire que le récepteur AhR module la plasticité cellulaire ? Il existe pour l'instant peu d'études à large échelle étudiant l'apport des interactions protéiques et celui du métabolisme.

La pharmacogénomique fonctionnelle peut être utile pour déterminer des cibles pertinentes.

La toxicogénomique fonctionnelle peut servir à prédire une toxicité au cours du développement.

La pharmacogénétique et la pharmacogénomique permettent de définir des populations réceptives, non réceptives ou susceptibles à la toxicité.

La génomique ou la protéomique ont un rôle dans le suivi pharmacodynamique d'un médicament et sont utiles dans les phases précliniques et cliniques.

D'autres technologies sont complémentaires : méthodes physiques et chimiques, imagerie (microscope confocal, déconvolution, force atomique, cellulaire, animal entier, homme), modèles transgéniques (cellulaires, animaux) ainsi que les modèles d'animaux humanisés qui peuvent s'avérer pertinents pour améliorer la transposition des observations de l'animal à l'homme.

L'interactome est l'étude du profil global des interactions protéiques par l'utilisation des techniques de biologie moléculaire et de spectrométrie de masse. Deux types d'interactions existent : soit des interactions nombreuses simultanées, soit des interactions multiples transitoires. La biologie structurale permet les prédictions *in silico* des modèles de structure, des modèles cinétiques et du métabolisme.

La biologie des systèmes a pour objectif de construire un modèle complet intégrant la génomique, la protéomique et la métabolomique de manière à être le plus quantitatif possible et de prédire les conséquences des perturbations du système. Elle se focalise sur le réseau de régulation des gènes, celui des interactions protéiques et/ou des voies métaboliques.

La toxicologie systémique intègre la biologie systémique ainsi que les informations toxicologiques traditionnelles. Elle décrit de nouveaux mécanismes et devrait apporter un pouvoir prédictif accru dans le développement de médicaments ou de produits chimiques mais elle dépend avant tout des modèles. ■

7 L'évolution de la toxicologie a-t-elle conduit à une réduction ?

Catherine Maisonneuve

Biologie SERVIER - 45 Gidy

Les domaines d'application de la toxicologie (ou évaluation de la sécurité des molécules) sont la pharmacie, la chimie, soumise à la réglementation REACH, et la cosmétique pour laquelle la réglementation a récemment imposé l'arrêt des essais chez l'animal.

Depuis toujours, la préoccupation des toxicologues est de prédire les effets secondaires pouvant se produire chez l'homme lors du contact avec un xénobiotique, en recherchant la marge de sécurité entre la dose sans effet toxique et la dose thérapeutique.

Les études toxicologiques sont soumises à réglementation et sont imposées par les autorités avant toute administration chez l'homme. Elles sont également utiles pour étudier le mécanisme des effets observés.

Ces dernières années, les moyens utilisés en toxicologie ont largement évolué grâce aux avancées tant scientifiques que technologiques et bio-informatiques. Ces progrès n'ont cependant pas permis la mise au point de test prédictif à 100 % (ni *in vitro*, ni *in vivo*) même si l'addition de plusieurs tests différents et complémentaires a permis d'améliorer la pertinence pour l'homme.

Les progrès scientifiques ont, non seulement amélioré cette prédictivité, mais ont également permis de diminuer le nombre d'animaux utilisés, en privilégiant les tests *in vitro* pour la sélection précoce des molécules. Suite à cette sélection, seules les molécules les plus prometteuses entrent en développement. C'est seulement à ce stade que les études *in vivo* sont requises par les autorités pour constituer le dossier préclinique d'évaluation de la sécurité des molécules.

La réglementation, elle-même, a évolué. L'harmonisation des études au niveau international, conséquence de la mise en place d'ICH (International Conference on Harmonisation) en particulier, a déjà permis de diminuer considérablement le nombre d'animaux utilisés. En effet, elle a évité les duplications d'études par une reconnaissance internationale des études régle-

mentaires, par une standardisation des protocoles et des examens, par une optimisation des études (en incluant des biomarqueurs spécifiques) pour essayer de répondre à un maximum de questions avec un minimum d'études.

La stratégie de développement d'une molécule a évolué et la chronologie des études a été modifiée.

Les études ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination) peuvent être positionnées de façon précoce grâce à des méthodes *in vitro*, permettant ainsi de comparer les différentes espèces animales et de sélectionner très tôt celle la plus proche de l'homme. Les études ADME *in vivo* sont elles aussi précoces pour confirmer (ou infirmer) rapidement les données obtenues *in vitro*.

Les premières études du développement, les études *in silico* puis les tests *in vitro*, permettent ainsi d'éliminer un grand nombre de molécules avant tout essai sur l'animal. Pour 10 000 molécules découvertes, 250 seulement seront testées en préclinique, seulement 5 arriveront en clinique chez l'homme et une seule obtiendra une AMM.

Les méthodes ont également évolué. Les techniques de prélèvement, d'analyse et d'examen ont été optimisées. Plus d'informations sont obtenues à partir d'un même animal, sans augmenter les contraintes pour l'animal. Le nombre et le volume des prélèvements de sang nécessaires aux analyses sont moindres (HB, TK) et si nécessaire, il est possible de placer des cathéters *in situ*. Certaines méthodes, autrefois invasives, sont maintenant non invasives (exemple de la télémétrie).

Suite à une étude rétrospective par les industriels, une évaluation critique de l'intérêt de certaines études réglementaires a abouti à la suppression des DL 50, et à la proposition de suppression des études AU (administration unique). Enfin, l'utilisation de souris transgéniques permet de proposer le remplacement des études de cancérogenèse long terme par des études court terme nécessitant moins d'animaux.

Les autorités régulatrices elles-mêmes se remettent en question. La révision en cours des guidelines ICH a en particulier, pour objectifs :

- > d'adapter les guidelines aux nouvelles avancées scientifiques,
- > de réduire le nombre d'animaux utilisés grâce à la suppression de certaines études (AU, photo-carcinogénicité), ou dans certains cas, de la seconde espèce, ou des groupes témoins, ou encore par l'inclusion de certaines études de toxicité spécifique dans des études de toxicité générale.

S'ajoutent à ces améliorations, les promesses que laissent entrevoir les nouvelles technologies telles que la toxicogénomique, l'imagerie médicale mais également la mise en place, très tôt dans le développement, de certaines études chez l'homme.

La toxicogénomique étudie les effets (ou la cinétique des effets) d'un produit sur les gènes de différents types cellulaires afin de prédire les organes cibles chez l'homme. Elle permet de comparer, suite à l'administration d'un produit à tester, les modifications du génome de l'individu aux changements toxiques observés. Comme plusieurs temps de prélèvements sont nécessaires, ces études nécessitent un nombre important d'animaux, en plus de ceux utilisés dans les études classiques.

Cependant, cette technologie présente des limites et des difficultés :

- > Quelle est la relevance réelle de l'induction/répression des gènes ? Avec quelles conséquences pathologiques ?
- > Quelles sont les interactions entre les différents gènes modifiés et quelles en sont les conséquences ?
- > Le nombre de gènes touchés est généralement important (et on ne les connaît pas tous !)
- > Les conclusions se faisant en comparant les effets observés à des bases de données, ces dernières doivent être augmentées pour diminuer le risque d'interprétation erronée ;
- > Enfin, les bases de données étant spécifiques d'un domaine d'activité (chimie, pharmacie etc.), leur élaboration est généralement longue et coûteuse.

L'imagerie, quant à elle, est une technologie lourde et coûteuse, difficile à mettre en place dans

un centre de toxicologie. Le recours à cette technique dans des études classiques serait alors contraignant pour les animaux (transport d'un centre à un autre, stabulation dans des conditions différentes, etc.). Les études spécifiques utilisant cette technologie sont difficiles à mettre en place en screening. L'imagerie est particulièrement intéressante pour la détection précoce des tumeurs ou l'étude de la fixation des molécules aux récepteurs cibles.

Une autre technique (dite du microdosing) appliquée chez l'homme avant les études cliniques classiques, donne des résultats encourageants. Elle consiste à injecter une dose très faible (1/100 de dose active ou $< 100 \mu\text{g}/\text{homme}$) pour évaluer de façon précoce les paramètres ADME chez l'homme. Cette méthode permet de valider très tôt dans le développement les données *in vitro* et, d'éliminer les molécules n'ayant pas une bonne biodisponibilité chez l'homme. Cependant, la dose utilisée étant très faible, cette étude n'est parfois pas prédictive de ce qui peut se passer à dose active. Avant de pouvoir appliquer cette technique chez l'homme, les autorités imposent la réalisation d'une étude par administration unique chez une espèce pertinente.

L'évaluation et la validation de ces nouvelles méthodes est en cours. Bien que très prometteuses, elles doivent prouver que leur prédictivité est supérieure ou au moins égale à celle des méthodes classiques. Elles sont parfois admises seulement en complément des méthodes en cours pour augmenter le poids de l'évidence. Dans d'autres cas, elles sont utilisées en screening ou comme études mécanistiques ou complémentaires pour affiner des données.

Ces quelques exemples montrent la prise en compte de plus en plus manifeste de la règle des 3 R en toxicologie. Pour chaque projet, le nombre d'animaux utilisés a baissé, notamment par la sélection plus précoce d'une molécule dans une série. Et même s'il faudra un certain délai pour que les nouvelles méthodes soient validées scientifiquement et réglementairement, leur utilisation se met en place progressivement. Cette évolution se traduit au quotidien, pour le toxicologue, par la recherche d'un équilibre entre l'application de la règle des 3 R et la sécurité du médicament. ■

Conclusion

Le colloque s'est achevé par une table ronde animée par Bernard Andrieux (Université Pierre et Marie Curie) sur le thème « La réduction : les domaines du possible ».

Ont participé à cette table ronde :

- > Robert Barouki, Université Paris Descartes, Directeur de l'U747 Inserm
- > Joseph-Paul Beaufays, Directeur de la Plateforme belge pour les méthodes alternatives, Fondation Prince Laurent
- > Philippe Hubert, Ineris, Directeur de la Plateforme française pour le développement des méthodes alternatives à l'expérimentation animale
- > François Lachapelle, Président du Gircor, BEA Inserm
- > Jean-Claude Nouët, Président de la Ligue française des droits de l'animal
- > Claude Reiss, Président d'Antidote Europe.

De 1991 à 2001, le nombre d'animaux de laboratoire officiellement utilisés en Europe a diminué d'environ 40 %. Cependant, après la stabilisation observée en 2004, l'enquête réalisée en 2007 semble montrer, en France, une légère augmentation malgré les progrès très importants faits dans de nombreux domaines :

- > harmonisation de la réglementation au niveau international,
- > programme de standardisation biologique appliquant le concept des 3 R dans de nombreuses monographies de la Pharmacopée européenne,
- > développement des méthodes d'imagerie du petit animal,
- > apport des « omiques » et en particulier de la génomique procurant une capacité prédictive en termes de toxicité,
- > mise au point de modèles humanisés plus pertinents,
- > développement de méthodes substitutives.

Dans la mesure où l'application de la réglementation REACH n'a pas eu encore d'incidence sur les résultats de l'enquête 2007, il faut en conclure que la recrudescence de l'utilisation de l'animal de laboratoire est liée à une augmentation du nombre de projets : plus de projets, bien conduits, se traduisant inévitablement par une augmentation du nombre d'animaux utilisés.

Il faudrait pouvoir disposer de statistiques fiables pour confirmer cette hypothèse. Rappelons cependant que le 2^e R de Russell et Burch (la Réduction) implique que l'on ne retienne que les projets les plus pertinents en termes de progrès importants pour la connaissance ou le bien-être de l'Homme. De ce point de vue, la proposition de directive relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques abrogeant la directive 86/609/CEE, en rendant obligatoire une évaluation éthique des projets utilisant l'animal de laboratoire, confiera cette mission aux nouveaux Comités d'éthique qui se mettent en place progressivement en France. ■



Directeur de la publication : Jean-Pierre Clot

Comité de rédaction : Jean-Pierre Clot, Philippe Delis,
Annie Reber, Jean-Pierre Rebière

Coordination : Isabelle Brasier

RECHERCHE EXPÉRIMENTALE ET PROTECTION DE L'ANIMAL DE LABORATOIRE
28, rue Saint-Dominique, 75007 Paris ●
Tél. : 01 47 53 09 12 - Fax : 01 47 53 73 76 - OPALassociation@aol.com