

Les méthodes alternatives en matière d'expérimentation animale

L'évaluation des effets toxicologiques des agents physiques et chimiques a nécessité depuis fort longtemps la réalisation de tests sur des animaux. Les fortes attentes sociétales en matière de santé et d'environnement (les effets des pesticides, des perturbateurs endocriniens) et les avancées scientifiques réalisées en matière de compréhension des mécanismes d'effets (à faibles doses, effets non linéaires ou non monotones, effets « cocktails ») obligent à repenser ces approches traditionnelles de l'évaluation. Par ailleurs, l'acuité qui s'attache aujourd'hui à la question du recours aux méthodes alternatives s'inscrit dans la continuité d'une évolution des perceptions culturelles : depuis le début du XIX^e siècle, la société manifeste une sensibilité croissante au bien-être animal et au respect des droits des animaux. Les méthodes alternatives doivent apporter des réponses à ces attentes, qui se révèlent parfois contradictoires. Le défi principal est d'obtenir des parties prenantes la reconnaissance de la pertinence de ces méthodes dans un certain nombre de domaines : leur validation dans un contexte réglementaire, leur utilisation en tant qu'outil de criblage industriel, ou qu'objet d'étude dans des publications scientifiques et, enfin, la reconnaissance de leur crédibilité par le grand public.

Par Philippe HUBERT* et Pierre TOULHOAT*

L'expérimentation animale

L'utilisation de « modèles animaux » fait partie des outils expérimentaux de l'investigation du vivant avec les études sur les tissus, les cellules et les molécules biologiques isolées. Elle se situe aussi aux côtés des approches observationnelles (études cliniques, épidémiologiques) qui s'appliquent à l'homme ou à l'animal. L'expérimentation animale demeure un outil privilégié en matière de recherche fondamentale, de prédiction des risques liés à l'exposition aux agents chimiques, physiques et biologiques, et de contrôle de la fabrication et de la qualité des produits de santé destinés à l'animal ou à l'homme. L'expérimentation animale se présente aujourd'hui sous un jour nouveau avec le développement des méthodes alternatives, notamment la modélisation mathématique du vivant, ou les approches *in vitro*.

L'apport de l'expérimentation en matière de recherche fondamentale

L'expérimentation animale permet d'évaluer la capacité des organismes vivants à répondre à des modifications de leur environnement par des mécanismes intégratifs pouvant évoluer sur le long terme. À ce titre, elle demeure une composante indispensable de la recherche dans les domaines de la biologie fondamentale et de la médecine.

Plusieurs prix Nobel de médecine sont déjà venus récompenser des travaux ayant eu recours à la fois à des techniques *in vitro* et à l'expérimentation animale. Ainsi, des travaux de recherche sur la mouche drosophile ont permis de découvrir le rôle des chromosomes dans l'hérédité (Prix Nobel de médecine décerné en 1933) ou le contrôle génétique du développement (Prix Nobel de médecine 1995). De même, ce sont des travaux d'expérimentation sur le calamar qui ont favorisé l'avancée de la connaissance sur le fonctionnement des neurones (Prix Nobel de médecine 1963).

L'expérimentation au service de la prédiction des risques liés à l'exposition aux agents chimiques, physiques ou biologiques

La prévention des éventuels effets néfastes liés à une exposition à un ou plusieurs agents chimiques, physiques ou biologiques présents dans notre environnement constitue un enjeu majeur de santé publique. L'expérimentation animale occupe aujourd'hui encore une place centrale pour évaluer la toxicité de ces agents, à savoir :

- ✓ la nature des effets toxiques résultant d'une exposition répondant à des conditions rigoureusement contrôlées ;
- ✓ le niveau de dosage ayant induit des effets toxiques ;

- ✓ la pertinence chez l'homme des effets observés chez l'animal.

Aujourd'hui, ces études toxicologiques ont néanmoins tendance à laisser une place beaucoup plus grande aux méthodes alternatives par rapport à l'expérimentation animale : tests *ex vivo*, tests *in vitro*, tests *in silico*, approches intégratives combinant l'ensemble des tests précités.

Le contrôle de la production et de la qualité des denrées alimentaires et des produits de santé destinés à l'animal ou à l'homme

Les crises sanitaires qu'ont déjà pu connaître la France et les pays européens dans le domaine des produits de santé (qu'ils soient destinés à l'homme ou à l'animal) et dans celui des produits alimentaires imposent d'observer la plus grande rigueur en matière de contrôle de la production et de la qualité de ces deux types de produits.

Pour des produits de santé comme les médicaments d'origine biologique (par exemple les vaccins) et les produits alimentaires, les études sont essentiellement réalisées sur des animaux. Ce sont en effet les seuls modèles qui, à ce jour, peuvent être utilisés compte-tenu de la forte variabilité que présente la composition de ces produits.

Néanmoins, l'industrie pharmaceutique s'efforce de développer des tests plus rapides, moins coûteux, et ne nécessitant pas le recours à des animaux.

Le recours à l'expérimentation animale en France et en Europe

Sur la base de recensements réalisés par le ministère chargé de la Recherche, on estime à environ 2 millions le nombre des animaux utilisés en France à des fins expérimentales en 2007. Cela représente une diminution de plus de la moitié par rapport au nombre d'animaux utilisés en 1984.

Les rongeurs représentent l'espèce qui est la plus utilisée ; viennent ensuite (mais dans des proportions très nettement inférieures) les lapins et les oiseaux. Dans les 27 pays de l'Union européenne, le nombre total d'animaux utilisés en 2008 s'élevait à un peu plus de 12 millions, dont 80 % de rongeurs et de lapins. Plus de 60 % des animaux utilisés ont servi à la réalisation d'études en biologie fondamentale (38,1 %), et à des travaux de recherche et développement en médecine humaine, en médecine vétérinaire et en dentisterie (22,8%). Les essais toxicologiques et autres évaluations de la sécurité ont représenté 8,7 % du total, soit environ 1 million d'animaux.

S'agissant de ces essais toxicologiques, on constate que :

- ✓ 50,81 % d'entre eux concernent la sécurité de produits, substances ou appareils utilisés en médecine humaine, en médecine vétérinaire ou en dentisterie ;
- ✓ la part des autres essais toxicologiques ou d'évaluation de la sécurité est de 21,45 %.

En matière d'évaluation de la sécurité, les méthodes d'essais portant sur la toxicité aiguë et subaiguë restent

les plus consommatrices d'animaux (45 %). Dans un peu plus de la moitié des cas, ces essais ont pour finalité le contrôle des produits, substances ou appareils utilisés en médecine humaine, en médecine vétérinaire ou en dentisterie.

Il n'est toutefois pas anodin de noter une utilisation accrue de l'animal en tant que matériel biologique pour réaliser des essais sur les cellules et autres essais dits « non animaux » (tableau 1 – rubrique « autres ») (voir la figure 1 de la page suivante).

L'évolution des connaissances et des mentalités : la règle dite des « 3R »

L'intérêt porté aujourd'hui aux méthodes alternatives s'inscrit dans la continuité d'une évolution progressive des perceptions culturelles, qui se manifeste, depuis le début du XIX^e siècle, par une sensibilité accrue de la société au bien-être animal et au respect des droits des animaux.

Ainsi, en France, la loi du 10 juillet 1976 est le premier texte législatif traitant de la protection de l'animal. Elle a fortement inspiré les dispositions actuelles du Code rural qui réglementent l'ensemble des pratiques concernant les animaux.

Dans ce contexte, la volonté d'encadrer les pratiques liées à l'expérimentation animale a reposé sur les deux objectifs suivants : éviter de recourir aux animaux à chaque fois que cela est possible ; lorsque cette utilisation ne peut pas être évitée, définir le point limite de souffrance ou de détresse animale admissible en se référant aux principes des « 3R » énoncés par Russell et Burch (RUSSELL (W.M.S.) & BURCH (R.L.), *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen, London, 1959).

Cette approche constitue le fondement de la démarche éthique liée à l'expérimentation animale en Europe et en Amérique du Nord. Les bonnes pratiques en matière d'expérimentation animale s'appuient, comme nous venons de le dire, sur la règle dite des « 3 R », à savoir :

- ✓ **Reduce** : réduire le nombre des animaux utilisés pour des expérimentations ;
- ✓ **Refine** : optimiser la méthodologie en matière de gestion des animaux, notamment les conditions d'élevage, de transport, d'hébergement, d'utilisation (en veillant à limiter, voire même éviter lorsque cela est possible, la douleur et la souffrance endurées par les animaux, notamment en fixant des points limites – critères d'interruption ou *end points*) ;
- ✓ **Replace** : remplacer à chaque fois que c'est possible les modèles animaux par des méthodes *in vitro* (étude sur des cellules humaines ou animales) ou *in silico* (modélisation mathématique à l'aide de programmes informatiques).

Les principes éthiques définis en application des trois règles précitées ont servi de base à l'élaboration de la directive de l'Union européenne 2010/63/UE du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Applicable depuis le 1^{er} janvier 2013, elle exige, pour une procédure donnée, que soient

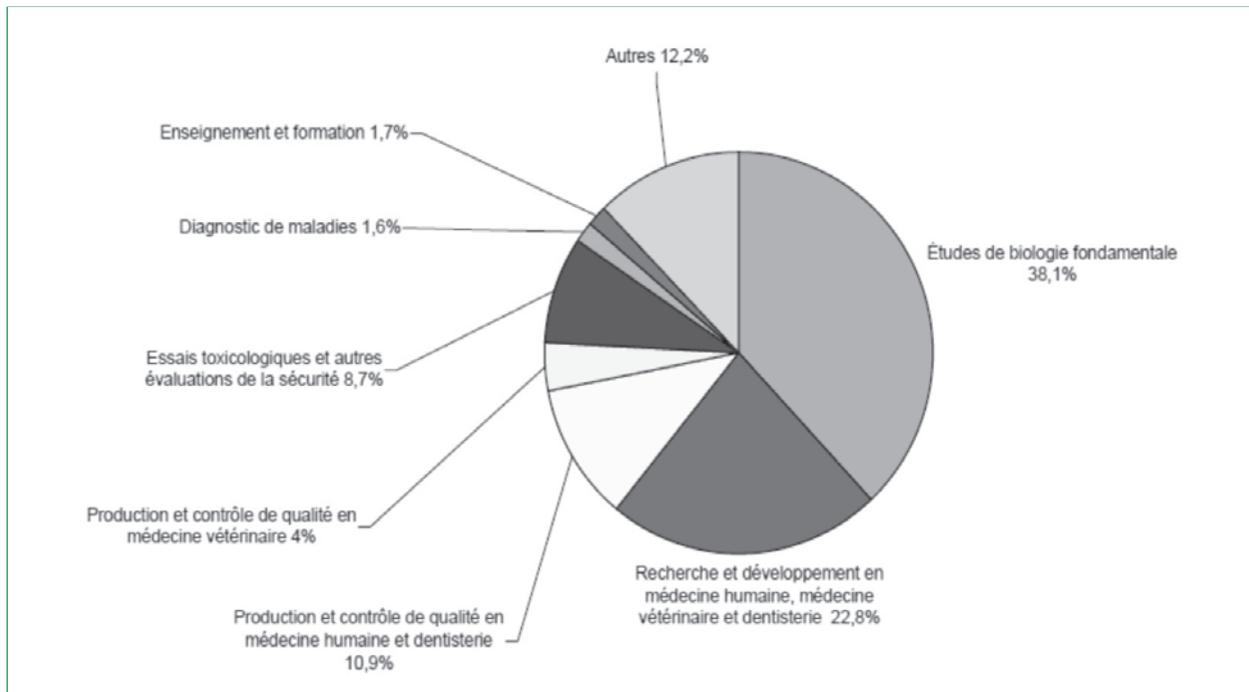


Figure 1 : Différents domaines d'application de l'expérimentation.

choisies en priorité (lorsqu'elles existent) les méthodes alternatives à l'expérimentation sur les animaux reconnues par l'Union européenne. Ces principes tirés des « 3R » sont également ceux qui s'appliquent pour procéder à l'évaluation de la sécurité des produits chimiques réalisée dans le cadre du règlement européen REACH (1907/2006).

Les méthodes alternatives et les principes des « 3R »

À ce jour, peu de réglementations recommandent de recourir exclusivement aux méthodes alternatives, excepté en cosmétologie. On distingue trois types d'outils alternatifs d'investigation du vivant : le travail sur du matériel cellulaire à partir de cultures en laboratoires (*in vitro*), l'utilisation des modèles bio-mathématiques (*in silico*), et l'expérimentation sur l'animal dès lors qu'elle s'inscrit dans le respect des 3R (*in vivo*). Certains associent également aux méthodes alternatives les « stratégies de test intégrées », qui visent à un cheminement optimal entre les divers types d'essais possibles avec pour finalité de réduire au minimum les cas de recours à des essais sur les animaux. On peut aussi y associer des méthodes reposant sur des analogies (regroupement de substances et recours aux méthodes de références croisées lorsque certaines substances présentent un nombre de points communs suffisant avec des substances déjà connues). Elles sont le plus souvent recommandées dans des approches intégratives combinant l'ensemble des outils alternatifs disponibles (*in vitro*, *ex vivo*, *in silico*) afin de n'utiliser l'animal qu'en dernier recours lorsque les autres méthodes d'évaluation n'ont pas permis d'apporter suffisamment d'informations.

L'amélioration des méthodes *in vitro* grâce aux avancées de la biologie fondamentale

Les outils correspondants sont utilisés depuis très longtemps et, s'ils deviennent plus complexes à mettre en œuvre, ils sont aussi plus informatifs. Des méthodes utilisant des bactéries ou des levures (comme le test d'Ames) sont déjà anciennes. Des essais portant sur des lignées cellulaires modifiées permettent d'identifier le fait qu'une substance puisse se lier à un récepteur (comme la production de luminescence quand un xénobiotique se lie à un récepteur d'estrogènes). On se situe de plus en plus à l'échelle intracellulaire : génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique. Mais des progrès sont aussi réalisés en matière de reconstitution de tissus (production de peau et de cornée humaines, d'épithélium alvéolaire humain), soit par voie de « co-culture » directe des différentes cellules, soit par voie de cultures séparées. Les avancées du « remplacement » dans le domaine de l'irritation cutanée et oculaire ont bénéficié de ces méthodes ; il en est de même pour l'étude du passage cutané des substances chimiques ou des principes actifs des médicaments à application topique (voir figure 2 de la page suivante).

Ces méthodes présentent un intérêt tout particulier dans des études mécanistiques très simples (une question concise appelant une réponse simple) ou dans les études de criblage (ou *screening*).

L'intérêt des méthodes *in silico*

Les méthodes *in silico* permettent de prédire des comportements et d'établir des propriétés de certaines molécules à partir de données expérimentales obtenues sur d'autres molécules, sur la base de leur interprétation méca-



Figure 2 : Coupe histologique d'une peau humaine *in vivo* (A) et d'un modèle d'épiderme humain reconstruit (*in vitro*) (SkinEthic Laboratories) (B).

Les organisations histologiques paraissent similaires ce qui pourrait indiquer (du moins en apparence) un fonctionnement cellulaire des cellules de l'épiderme reconstruit fidèle à celui de l'épiderme *in situ*.

nistique. Aujourd'hui, les progrès proviennent pour l'essentiel de l'accumulation de données biologiques fines.

On notera qu'ils sont liés à l'amélioration des modèles *in vivo* et *in vitro*, et bien sûr à l'optimisation de l'organisation du partage des connaissances tant sur le plan juridique que sur le plan des systèmes d'information. On utilise des modèles QSARs (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) pour augurer de l'activité biologique d'une molécule à partir de sa structure chimique. Il a été estimé que l'utilisation de ces approches alternatives pour évaluer la toxicité d'une molécule pourrait permettre de réduire de 70 % le recours à certains tests sur des animaux. L'autre outil privilégié est le modèle PBPK (*Physiologically Based Pharmacokinetics*), qui permet de décrire l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination des substances chimiques chez l'homme et l'animal. Ces outils permettent de ne pas recourir à des essais quand une équivalence voie à voie peut être établie (par exemple, inhalation vs ingestion), ou en en réduisant le nombre lorsque l'organe cible a pu être mieux identifié. Seuls ou associés, les QSARs et les PBPK peuvent guider le développement de nouvelles molécules, en en prédisant, le plus en amont, possible leur potentiel d'effets (toxiques ou bénéfiques) et leur capacité à atteindre l'organe ciblé. Un effort particulier est en train d'être fourni, notamment au niveau de l'OCDE et, aux États-Unis, de l'Environmental Protection Agency (EPA), pour arriver à une harmonisation et une meilleure disponibilité des bases de données et des modèles associés.

On peut aussi faire mention du développement de certains projets comme celui concernant le cœur virtuel (qui une fois mis au point jouera un rôle direct d'aide au diagnostic (1)) ou celui concernant le foie virtuel (voir par exemple l'action de l'EPA en la matière, aux États-Unis, ou le réseau foie virtuel développé par l'Allemagne).

Une amélioration des méthodes in vivo favorisée par les avancées réalisées en matière d'imagerie médicale et par une meilleure connaissance du système nerveux

Les méthodes *in vivo* combinent les différentes techniques de diminution de la douleur (examen clinique), l'ima-

gerie du petit animal *in vivo* (IRM, ultrasons, bioluminescence, scintigraphie, tomographie), la télémétrie (enregistrement de paramètres physiologiques en continu), l'utilisation d'espèces réputées présenter une moindre sensibilité ou, au contraire, l'exclusion d'espèces chez lesquelles a pu être identifiée une forte sensibilité, comme ce fût le cas pour les céphalopodes.

De même, le recours à des modèles animaux transgéniques (et donc répondant mieux aux tests réalisés) permet aussi une réduction importante du nombre des animaux utilisés.

Conclusion et perspectives

Popularisées par le règlement REACH, les méthodes alternatives se déploient sur un domaine beaucoup plus large que celui couvert *stricto sensu* par le règlement. Elles sont utilisées en recherche fondamentale, pour la réalisation d'études à visée réglementaire, de travaux cliniques, et aussi d'opérations de *screening* en matière de développement de nouvelles molécules.

Dans le domaine de la recherche, ces différentes méthodes sont des outils précieux qui permettent de mieux comprendre la physiologie des organismes et les mécanismes des effets des substances sur ces derniers.

Ce développement s'est d'ailleurs opéré en dehors de toute contrainte réglementaire, simplement sous l'effet des avancées intervenues dans le domaine des sciences du vivant, et sans que l'objectif des développeurs n'ait été forcément d'améliorer les prédictions sur les dangers potentiels des substances réglementées ni même de développer des méthodes alternatives à l'expérimentation animale.

Concernant la toxicologie et l'écotoxicologie, les fortes attentes sociétales en matière de santé et d'environnement (les effets des pesticides, des perturbateurs endocriniens) et les avancées scientifiques réalisées en matière de compréhension des mécanismes d'effets (à faibles doses, effets non linéaires ou non monotones, effets « cocktails ») obligent à repenser les approches traditionnelles de l'évaluation des effets des agents chimiques ou physiques.



© Marc DHENAIN – CRC.

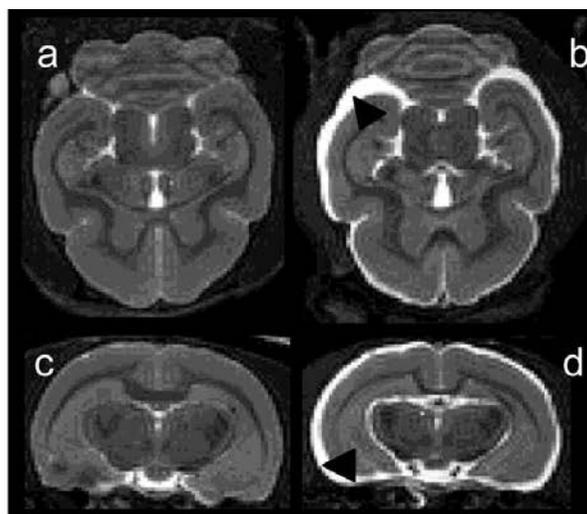


Figure 3 : Sections horizontales (a, b) et coronales (c, d) obtenues par IRM du cerveau d'un primate microcèbe murin (photographie de gauche). Le recours à l'IRM permet de mettre en évidence, *in vivo*, une atrophie cérébrale importante (b, d), entraînant une augmentation du liquide céphalorachidien autour du cerveau (flèches), chez des animaux souffrant de pathologies cérébrales liées au vieillissement.

S'y ajoute le besoin de disposer d'outils de criblage à fort débit pour être en mesure de tester plus rapidement des molécules dont le nombre ne cesse de croître. Cela pousse à une généralisation du recours à ces nouveaux outils mais aussi à l'adoption d'une nouvelle vision de l'approche prédictive. Plutôt que de traiter individuellement chaque « essai réglementaire » appelé à être remplacé, une approche plus globale et plus ambitieuse consisterait à mieux utiliser l'expérimentation. La rénovation de la conception de ces essais a fait l'objet d'un travail réalisé par l'Académie nationale des Sciences américaine, dont le rapport est paru en fin d'année 2007 (*Toxicity Testing in the Twenty-first Century: A Vision and a Strategy* ; Committee on Toxicity and Assessment of Environmental Agents, National Research Council (<http://www.nap.edu/catalog/11970.html>)).

Les approches prédictives sont ainsi privilégiées, ce qui a justifié la création, en 2008, par l'INERIS, du réseau ANTIOPES, qui rassemble 11 établissements dont l'INSERM et qui est dédié au développement des approches prédictives en toxicologie et en écotoxicologie. De même, tous les acteurs (chercheurs, autorités, industriels, associations) engagés dans le développement ou l'utilisation de méthodes alternatives se sont réunis au sein de plateformes. Ainsi, au niveau européen, ECOPA regroupe douze plateformes, dont la plateforme française, FRANCOPA (<http://www.francopa.fr>). Il s'agit de créer les conditions d'une plus forte acceptation du recours aux méthodes alternatives dans les pratiques de recherche et d'enseignement, et bien sûr que ce mouvement se traduise au niveau réglementaire.

Le défi principal pour ces méthodes alternatives est d'obtenir la reconnaissance des parties prenantes : leur validation dans un contexte réglementaire, leur utilisation en tant qu'outil de criblage industriel, ou qu'objet d'étude dans des

publications scientifiques et, enfin, la reconnaissance de leur crédibilité par le grand public.

Une telle reconnaissance se conçoit aisément lorsqu'il s'agit de se référer à une méthode existante qui a déjà fait ses preuves, en dépit des difficultés pratiques qui ont pu être rencontrées. Mais, comme nous l'avons évoqué plus haut, on ne saurait en toxicologie prédictive se contenter d'opérer des comparaisons en se basant sur un référentiel qui daterait des années 1980. Les exemples des nanoparticules et des perturbateurs endocriniens sont suffisamment édifiants à ce sujet. La validation requiert non seulement l'acquisition d'informations portant, par exemple, sur la maîtrise des mécanismes d'action des substances toxiques aux différentes échelles du vivant (molécule, cellule, organe, organisme...), mais aussi la capacité de modéliser les effets observés dans différentes situations d'exposition aux risques de manière à pouvoir répondre avec pertinence aux différentes questions qui viendraient à se poser. De même, peuvent s'avérer nécessaires la génération de données, y compris celles issues de tests réalisés sur l'homme et l'animal, et la mise en œuvre d'essais dédiés à l'appréciation de la capacité prédictive et de la robustesse de ces méthodes alternatives.

Autant de problématiques qui sont au cœur de projets de plateformes devant permettre l'association de partenaires publics et privés autour du partage de données à l'échelle nationale et européenne, et de la nécessité de définir une gouvernance transparente et ouverte à toutes les parties prenantes.

Notes

* Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques.

(1) http://ec.europa.eu/research/infocentre/article_en.cfm?id=/research/star/index_en.cfm?p=121_main&item=Infocentre&artid=23574