



Plate-forme nationale pour le développement des
méthodes alternatives en expérimentation animale

ETAT DES LIEUX
DES METHODES ALTERNATIVES
DANS LE DOMAINE
DE L'EXPERIMENTATION ANIMALE
EN FRANCE

COMITÉ DIRECTEUR de FRANCOPA

Présidente

Mme Francelyne MARANO (Université Paris Diderot)

Directeur

Mr Philippe HUBERT (INERIS)

Membres

Mr Jean-Pierre CLOT (OPAL)

Mme Anne DUX (FEBEA)

Mme Isabelle FABRE (ANSM)

Mme Valérie GUIRAL-TREUIL (SIMV)

Mme Magali JACQUIER puis Mr Ivan BALANSARD (CNRS)

Mr Hervé JUIN (INRA)

Mr François LACHAPELLE puis Mme Brigitte RAULT (INSERM)

Mr Rémi MAXIMILIEN (CEA)

Mr Jean-Claude NOUËT (LFDA)

Mr Marc PALLARDY (SPTC)

Mme Marie ZIMMER-JEHANNE (UIC)

Mme Claire SIBENALER (LEEM)

Mr Eric THYBAUD (INERIS)

Mme Anne TILLOY (ANSES)

Mme Virginie VALLET-ERDTMANN (MESR)

Membres du collège d'experts :

Mme Nathalie ALEPEE (L'Oréal)
Mme Fanny BOISLEVE (Yves Rocher)
Mr François BUSQUET (CAAT)
Mme Marie-Christine CHAGNON (Université AgroSup DIJON)
Mr Jean-Michel CHAPSAL (Sanofi-Pasteur)
Mme Nancy CLAUDE (SERVIER)
Mr Charles-Henry COTTART (Université Paris Descartes)
Mme Valérie FESSARD (ANSES)
Mme Isabelle GAOU (ARKEMA)
Mme Christine GARCIA-MERCIER (SEPPIC)
Mr Thierry GODARD (ANSES)
Mme Elise GRIGNARD (ECVAM – JRC)
Mr Christophe JOUBERT (CEA)
Mme Saadia Kerdine-ROMER (INSERM – Université Paris Sud)
Mme Aude KIENZLER (ECVAM)
Mme Martine KOLF-CLAUW (ENVT)
Mme Nathalie LEDIRAC (CEHTRA)
Mr Emmanuel LEMAZURIER (INERIS)
Mr Grégory LEMKINE (WATCHFROG)
Mme Catherine MAISONNEUVE (SERVIER)
Mme Cécile MICHEL (ANSES)
Mr Alexandre PERY (AGROSPARITECH)
Mr Sébastien PERROT (ENVA)
Mr Michel PLOTKINE (Université Paris Descartes)
Mme Sonia PRIEUR (ANSM)
Mr Patrice RAT (Université Paris-Descartes)
Mme Annie REBER (Université ROUEN)
Mme Lysiane RICHERT (Université Besançon)
Mr Didier SAUVAIRE (ANSM)
Mme Anne TILLOY (ANSES)
Mme Geneviève UBEAUD-SEQUIER (Université ILLKIRCH)
Mme Catherine VOGT (Université LYON)

Autres contributeurs :

Mr Ivan BALANSARD (CNRS)
Mr Stéphane BINET (INRS)
Mme Anne BRAUN (INERIS)
Mme Céline BROCHOT (INERIS)
Mr Manuel GEA (ADEBIOTECH)
Mme Anne GOURMELON (OCDE)
Mr Benoît DE GUILLEBON (APESA)
Mme Danielle LANDO (ADEBIOTECH)
Mr Éric LECLERC (UTC)
Mlle Cosette LE SOUDER (Interne en Pharmacie)

Coordination :

Mme Isabelle FABRE (ANSM)
Mr Enrico MOMBELLI (INERIS)

Secrétariat :

Mme Florence CHABAUD (ANSM)

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS : FRANCOPA	7
RESUME	9
LES RECOMMANDATIONS	12
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	13
INTRODUCTION	14
Pourquoi des méthodes alternatives en expérimentation animale ?	14
L'expérimentation animale parmi les outils d'investigation du vivant	17
LES METHODES ET LE CADRE DE LEUR DEVELOPPEMENT	22
I - LES MÉTHODES ALTERNATIVES « EN » EXPÉRIMENTATION ANIMALE	23
1. La définition : les Trois R, le remplacement, la réduction et le raffinement	23
2. Les méthodes alternatives (3R) disponibles, leur pertinence et leurs limites	25
II- LA PLACE DES MÉTHODES ALTERNATIVES DANS LES CADRES LÉGISLATIFS ET RÉGLEMENTAIRES	48
1. La Directive 2010/63/UE	48
2. Cas des produits chimiques	48
3. Cas des produits cosmétiques	50
4. Cas des médicaments	50
5. Les autres réglementations	52

III- LES NIVEAUX DE RECONNAISSANCE, DE LA VALIDATION SCIENTIFIQUE A LA VALIDATION REGLEMENTAIRE	58
1. La validation scientifique	58
2. La validation réglementaire	58
3. Les méthodes validées par les instances réglementaires	61
IV- LE CALENDRIER PROSPECTIF DES METHODES EN COURS DE DEVELOPPEMENT	65
1. Contribution au niveau national	66
2. Contribution aux niveaux européen et international	67
3. Structuration – Valorisation des méthodes alternatives	67
V- LES ACTEURS DANS LE DOMAINE DES MÉTHODES ALTERNATIVES, DE LEUR CONCEPTION A LEUR UTILISATION	68
1. Les acteurs nationaux	69
2. Les acteurs européens	91
3. Les acteurs internationaux	96
VI - LES RECOMMANDATIONS ET LE ROLE DE FRANCOPA DANS LEUR MISE EN ŒUVRE	99
CONCLUSIONS et PERSPECTIVES	111
LES ANNEXES	112
ANNEXE 1 LES CADRES LEGISLATIFS ET REGLEMENTAIRES DES METHODES ALTERNATIVES EN EXPERIMENTATION ANIMALE	113
ANNEXE 2 LE PROGRAMME DETAILLE DE L'INRS	116
ANNEXE 3 LE PROGRAMME DETAILLE DE L'ANSES	120
ANNEXE 4 LES PROGRAMMES EUROPEENS ET INTERNATIONAUX	126
ANNEXE 5 LISTE DES CENTRES 3R	128
ANNEXE 6 LE GLOSSAIRE	131

AVANT-PROPOS : FRANCOPA

Un Groupement d'Intérêt Scientifique, GIS nommé « plateforme française pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale », a été lancé conjointement par le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche et l'ANSM (ex AFSSAPS) en novembre 2007 afin de fédérer l'ensemble des acteurs nationaux agissant dans le domaine des méthodes alternatives en expérimentation animale.

En effet, il est apparu indispensable, à l'image des autres pays européens, qu'une structure soit mise en place pour faire connaître à nos concitoyens la réalité de l'expérimentation en biologie animale et humaine et développer des outils innovants afin de la faire évoluer. Les activités de FRANCOPA devraient permettre d'aller au-devant de questions qui sont posées à la communauté scientifique :

- Pour mieux faire comprendre les enjeux de la science et de la recherche biomédicale et les nécessités des évaluations réglementaires de dossiers industriels pour mise sur le marché, dans un souci de sécurité du consommateur, du travailleur ainsi que des animaux et de réduire la contrainte que ces derniers subissent tout en améliorant la qualité des résultats obtenus.
- Pour susciter le développement et l'utilisation des méthodes susceptibles de réduire ou remplacer le recours aux animaux, et de réduire la contrainte que ces derniers subissent tout en maintenant la qualité des résultats obtenus,
- Pour centraliser les progrès réalisés et assurer leur promotion en valorisant les résultats obtenus.

Depuis cette date, FRANCOPA, fait partie du réseau des 16 plateformes nationales européennes dédiées aux méthodes alternatives dont les activités sont coordonnées par la plateforme européenne ECOPA¹. FRANCOPA, plateforme française s'est structurée autour des 4 piliers que sont la recherche académique, les agences réglementaires, l'industrie et les associations de protection animale, sans oublier les pouvoirs publics, ceci afin de répondre aux recommandations de la plateforme ECOPA.

FRANCOPA a annoncé dans son programme de travail promouvoir les méthodes qui appliquent le concept de 3R (*remplacer, réduire, raffiner*) c'est-à-dire toute méthode qui permet de réduire la souffrance des animaux et d'améliorer leur bien-être (raffiner), de réduire le nombre d'animaux utilisés sans pour autant impacter les données nécessaires à établir la sécurité du consommateur, du travailleur et des animaux (réduire) ainsi que de s'affranchir de l'expérimentation animale (remplacer).

¹ ECOPA – European Consensus-Platform for Alternatives: <http://www.ecopa.eu/>

Le rapport publié par FRANCOPA en 2011 dont l'objectif était d'établir un état des lieux des méthodes alternatives dans le domaine de l'expérimentation animale en France doit être mise à jour régulièrement pour quatre raisons principales :

- La réglementation européenne sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques évolue et devient de plus en plus exigeante vis-à-vis de l'expérimentation animale, le recours à des méthodes alternatives est à ce jour incontournable dans les processus réglementaires des produits.
- Les nombreuses réglementations sur les substances et produits évoluent aussi, avec une acceptation des méthodes alternatives qui ne peut que s'améliorer.
- Le processus de validation des méthodes alternatives à l'expérimentation animale a été optimisé en termes d'efficacité et de pertinence réglementaire depuis la création d'EURL ECVAM en 2013 avec comme conséquence attendue une accélération de l'adoption de nouvelles méthodes aux niveaux de l'OCDE et de la Pharmacopée européenne.
- Les avancées de la biologie ainsi que les nouvelles approches et stratégies en toxicologie offrent toujours plus d'opportunités pour développer des outils novateurs.

RESUME

La mise à jour de ce rapport est le résultat d'un travail collectif de FRANCOPA « plateforme française pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale ».

Les principales modifications apportées à la première publication concernent :

- Le recensement des méthodes alternatives intégrant les nouveaux outils disponibles,
- La prise en compte de l'évolution des réglementations des produits, conséquence de la mise en œuvre de la Directive 2010/63/UE,
- La mise à jour des bilans et programmes d'activité des partenaires de FRANCOPA,
- Le bilan des recommandations issues de l'analyse de l'enquête menée auprès des acteurs nationaux du domaine lors de la rédaction du premier rapport ainsi que de nouvelles recommandations engageant de nouvelles perspectives de travail de FRANCOPA.

L'objet du rapport : les méthodes alternatives

Les méthodes considérées sont les méthodes alternatives telles que définies par Russell & Burch en 1959, lorsque a été établie la règle dite des 3R. Il s'agit de méthodes pouvant se substituer à l'utilisation de l'animal (*Replacement*), mais aussi de celles capables de réduire le nombre d'animaux utilisés (*Reduction*) ou encore de diminuer la douleur ou la détresse imposée aux animaux tout en retirant un niveau élevé d'information de l'étude (*Refinement*, traduit en Français par optimisation ou raffinement).

Les méthodes alternatives disponibles

Le rapport ne traite pas d'outils d'investigation du vivant comme la recherche clinique, l'épidémiologie ou l'observation sur volontaire sain. Il se focalise sur l'expérimentation animale et ses alternatives. Il décrit des exemples de méthodes selon les catégories suivantes :

- ▶ **Les méthodes de substitution** (*replacement*) sont les méthodes *in silico* (expression devenue courante pour les calculs effectués sur ordinateur) basées sur la modélisation de données, les méthodes *in vitro* utilisant des éléments biologiques comme les tissus, les cellules, les organites, les biomolécules (ADN, protéines), des méthodes de chimie analytique, les organes bio artificiels.
- ▶ **Les méthodes de réduction** (*reduction*) sont les méthodes qui visent à réduire le nombre d'animaux utilisés dans les études grâce à des plans d'expérience plus efficaces et les méthodes *ex vivo* (tissus, organes prélevés d'organismes vivants). La réduction de l'utilisation des animaux peut être obtenue en développant le recours aux techniques « Omics » (mesures, souvent à haut débit, de matériel génétique, de protéines, de métabolites) et en partageant les banques de données ainsi que par la réduction des effectifs des lots expérimentaux en appliquant des tests statistiques pertinents ou par la mise en œuvre des stratégies de réduction telles que les approches intégratives.
- ▶ **Les méthodes de raffinement** (*refinement*) sont par exemple l'utilisation d'espèces présumées moins sensibles et l'utilisation de techniques d'exploration non invasives (imagerie du petit animal, RMN *in vivo*, examen clinique, évaluation comportementale, télémétrie) sachant que ces méthodes sont aussi des méthodes de réduction voire de substitution. Ce sont également toutes les méthodes telles que le conditionnement,

l'enrichissement et toutes les bonnes pratiques de zootechnie qui améliorent la vie des animaux tout en augmentant la validité des modèles. Ce sont enfin et surtout toutes les méthodologies de conception des projets et d'analyse des résultats, de choix pertinent de l'espèce du modèle et des témoins de contrôle de la variabilité et de la reproductibilité qui peuvent contribuer à une meilleure transposition des résultats à l'Homme.

A ce jour, peu de méthodes de substitution peuvent être utilisées en méthode unique. Elles sont le plus souvent utilisées 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 n'ont pas permis d'apporter les informations suffisantes. Ces approches ont toutes des limites et des axes de progrès que le rapport a tenté de mettre en évidence.

L'utilisation des méthodes, reconnaissance et validation

Il existe deux utilisations majeures des méthodes alternatives qui correspondent aux domaines d'utilisation de l'expérimentation animale, mais qui ne sont pas soumises aux mêmes impératifs. Dans les deux cas se pose une question essentielle, celle de leur validité que le rapport aborde aussi.

La recherche fondamentale et appliquée au domaine médical développe et utilise les outils alternatifs sans animaux pour la compréhension du fonctionnement de base des cellules en biologie cellulaire et moléculaire et, de plus en plus, tissulaire et organique (cf. organes bio-artificiels) ainsi qu'en complément de l'expérimentation animale pour l'étude des mécanismes biologiques intégrés (étude des pathologies, des comportements, etc.). Par essence, les méthodes sans animaux utilisées dans ce domaine sont des outils pour la recherche voire même des objets d'étude.

Utiliser le terme de Remplacement est inapproprié car elles apportent une contribution originale et spécifique à des projets sans chercher à se substituer à des méthodes anciennes qui deviennent obsolètes.

Elles n'ont pas à faire l'objet de validations au sens réglementaire mais une normalisation ou une certification de certaines de ces méthodologies peut s'avérer nécessaire pour crédibiliser et assurer la reproductibilité des procédures expérimentales. Aujourd'hui c'est surtout dans la réduction et le remplacement que la recherche fondamentale doit faire porter ses efforts avec une vision positive d'amélioration de la qualité de la recherche à travers l'optimisation des procédures.

Les études effectuées dans un contexte réglementaire portent sur des domaines nombreux. On cite souvent en premier lieu le règlement REACH et la classification (CLP), mais il ne faut pas oublier la réglementation des cosmétiques qui a interdit l'expérimentation animale. D'autres domaines sont ceux des produits phytopharmaceutiques et des biocides (communément regroupés sous le nom de pesticides). Les médicaments humains et vétérinaires, ainsi que les dispositifs médicaux sont un autre champ à considérer. Il faut aussi citer les réglementations touchant aux additifs alimentaires et aux contenants alimentaires. D'autres réglementations ne portent pas forcément sur les substances intentionnellement produites, comme la directive cadre sur l'eau.

C'est dans ce domaine que la question de la validation est la plus cruciale. Les méthodes ont pour objet de donner des réponses ciblées à des questions restreintes (par exemple toxicité d'une substance ou contrôle d'un lot de vaccin). Une méthode recevable par les autorités réglementaires doit être validée afin d'apporter la preuve de sa pertinence, de sa capacité à détecter les effets observés chez l'animal ou chez l'Homme et de sa reproductibilité.

Des « validations réglementaires » de méthodes non animales sont essentiellement initiées au niveau européen par EURL ECVAM du centre de recherche commun (JRC) à Ispra pour les substances chimiques, la DEQM pour le médicament et au niveau international par l'ICCVAM (USA). Le processus de validation tel qu'il a été défini à l'origine par l'ECVAM créé en 1991, a été amélioré afin d'en réduire la durée et le coût, freins à l'utilisation pratique des méthodes alternatives mais aussi afin d'être plus en phase avec les exigences réglementaires. Il n'en demeure pas moins que la lourdeur des démarches de validation reste peu compatible avec la rapidité de l'évolution des connaissances ce qui explique le peu de succès que rencontrent certaines de ces méthodes qui sont déjà obsolètes au moment où elles sont validées.

La reconnaissance unilatérale internationale est, pour les substances, portée par l'OCDE sous forme de ligne directrice, ou par la pharmacopée européenne. A noter que certaines réglementations (cf. REACH) ont assoupli le processus acceptant dans certaines circonstances des méthodes « reconnues », c'est-à-dire qualifiées sans être validées par ces instances. Il n'en demeure pas moins que ces méthodes validées doivent faire l'objet d'une réévaluation permanente au regard de l'avancée des connaissances scientifiques et des méthodes.

Les acteurs

En 1986, l'Europe, a avancé dans le domaine de la protection animale, en publiant une Directive (86/609/CEE) visant à encadrer la protection des animaux utilisés dans un cadre expérimental. L'application de cette Directive s'est accompagnée, au niveau européen, de la création de nombreuses structures dédiées au développement et à la validation des méthodes alternatives : ECVAM² en 1991 pour la conduite des études de validation, ECOPA, plateforme européenne assurant la coordination des activités des plateformes nationales en 1999, EPAA créée en 2005, en partenariat entre la CE et l'industrie afin de favoriser la communication et le transfert technologique entre les différents secteurs industriels.

En France, la communauté scientifique, devançant le législateur, a mis en place des Comités d'éthique chargés d'évaluer toute étude réalisée sur l'animal. Cette démarche s'est structurée à un niveau national grâce au Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale (CNREEA). Par ailleurs, les enseignements destinés à la pratique éthique sont dispensés dans le cadre des formations réglementaires pour la mise en œuvre d'expérimentation animale, l'approbation de ces formations étant assurée par la Commission nationale de l'expérimentation animale (CNEA).

La Directive 86/609/CEE remplacée en 2010 par la Directive 2010/63/UE a mis en place de nouvelles dispositions plus contraignantes vis-à-vis de l'utilisation d'animaux en recherche biomédicale avec pour objectif d'améliorer leur protection

Actuellement, des collaborations se sont mises en place au niveau international afin d'obtenir une harmonisation des pratiques et des réglementations.

Dans cette perspective la création en 2007 du GIS « plateforme française pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale » nommé FRANCOPA a permis à la France de rejoindre la plateforme européenne ECOPA.

² Remplacé par EURL ECVAM, laboratoire de référence de l'Union européenne pour la promotion des méthodes de substitution à l'expérimentation animale créé en 2010 pour répondre au besoin croissant de mettre au point et faire valider des nouvelles méthodes dans l'Union européenne.

Les recommandations

FRANCOPA a énoncé des recommandations dans les domaines suivants :

Pour éviter les expérimentations superflues,

FRANCOPA propose :

- D'accélérer l'optimisation des processus de contrôle et des procédures d'essai,
- D'organiser les dispositifs d'échange et l'utilisation des résultats acquis,
- De promouvoir la publicité et l'accès aux résultats négatifs.

Pour intégrer les méthodes alternatives dans l'enseignement des sciences de la vie,

FRANCOPA propose :

- Une formation générale,
- Des formations spécifiques,
- D'accroître le recours aux simulations dans l'enseignement.

Pour orienter la recherche vers des outils novateurs,

FRANCOPA propose :

- De mettre en place un « centre 3R » pour financer les développements spécifiques.

Pour construire, faire connaître et reconnaître les nouvelles approches et leurs opérateurs,

FRANCOPA propose :

- De passer de la recherche à des outils opérationnels appuyés sur un réseau de ressources,
- De se doter des moyens de faire reconnaître la qualité des méthodes innovantes (normalisation, certification volontaire, autres processus de validation),
- De structurer l'apport national à la validation réglementaire,
- De promouvoir la préoccupation 3R dans les démarches de recherche sur le vivant,
- De faire connaître les acteurs et outils opérationnels disponibles,
- D'intégrer la démarche aux stratégies nationales de recherche

Pour définir des politiques par domaine et évaluer leur avancement,

FRANCOPA propose :

- De cibler et construire des politiques sectorielles en fonction du potentiel de réduction,
- De construire une nomenclature des méthodes alternatives pour permettre leur recensement,
- De connaître de façon détaillée les utilisations de l'expérimentation animale afin d'identifier des cibles pour l'application des 3R.

Conclusions et perspectives

Pour élaborer ce rapport réactualisé, FRANCOPA s'est réjoui de la participation active des acteurs impliqués et notamment de la mobilisation d'instituts de recherche, d'EPICS et d'agences.

Des limites doivent être signalées. Ainsi le rapport ne traite pas de la pertinence de telle ou telle méthode et il ne va pas jusqu'à donner des horizons temporels pour la mise au point des différentes méthodes.

L'intérêt suscité par le sujet auprès des scientifiques rencontrés montre une réelle mobilisation qui vient des préoccupations éthiques sur l'expérimentation animale mais aussi du fait des avancées importantes dans la compréhension des mécanismes du vivant, avancées elles-mêmes rendues possibles par les nouveaux outils d'investigation disponibles aujourd'hui.

L'analyse montre à quel point le développement des méthodes suscite et profite des développements des connaissances sur le vivant. En toxicologie, les méthodes alternatives dynamisent les recherches dans ce domaine. Parallèlement, le développement d'outils d'investigation et de la compréhension de mécanismes, ouvrent la voie à des nouvelles méthodes. Les préoccupations entrent donc en synergie de façon remarquable avec la démarche de structuration de la toxicologie et de l'écotoxicologie, par exemple, quand il s'agit de passer d'une liste à priori d'essais opposables à une confirmation des modes d'action supposés grâce à des expérimentations ciblées (stratégies de test intégrées).

Cette même synergie s'observe avec la dynamique mise en place dans le domaine des sciences de la santé.

Ainsi, aujourd'hui, le développement de ces méthodes n'est pas une démarche isolée du reste de la démarche de développement des connaissances, qu'il s'agisse de toxicologie, de biologie, de thérapie. FRANCOPA entend accompagner cette démarche globale et faciliter le passage des développements amont aux applications.

Toutefois, FRANCOPA n'est pas uniquement un lieu d'échange scientifique et la généralisation des bonnes pratiques, la circulation de l'information et la recevabilité sociétale doivent être traitées.

FRANCOPA doit s'associer aux moyens qui seront mis en place pour assurer le suivi de la mise en œuvre des méthodes et des recommandations émises.

INTRODUCTION

Ce rapport a pour objet de dresser un état des lieux des méthodes alternatives en expérimentation animale en France et de mettre en perspectives les travaux nationaux avec ceux réalisés aux niveaux européen et international. Avant d'approfondir ce sujet, il importe de comprendre pourquoi les expérimentations sont utilisées, et pourquoi on peut envisager des alternatives.

POURQUOI DES METHODES ALTERNATIVES EN EXPERIMENTATION ANIMALE ?

► *L'évolution de la sensibilité sociale, les droits de l'animal, le bien-être animal*

La vision anthropomorphique de l'animal n'a cessé d'évoluer depuis le début de l'existence de l'humanité au sens des droits et des devoirs que s'accorde l'espèce humaine vis-à-vis des espèces animales³.

Au cours de la préhistoire, la relation ancienne et réciproque de prédateur à proie entre l'Homme et l'animal a en effet peu à peu évolué vers un rapport de dominant à dominé, avec la domestication de certaines espèces. Le fondement de ce rapport fut dicté par « l'utilité » de l'animal pour l'Homme – « utilité » alimentaire et « utilité » comme force de travail. Les rapports entre l'Homme et les animaux évoluent aussi en parallèle des évolutions de la société ; le regard que portent les « citadins » sur les animaux diffère de celui que leur portent les « ruraux ».

La déification de quelques espèces animales dans la plupart des civilisations peut en partie expliquer la notion d'animal de compagnie que nous connaissons. Pour d'autres sociologues, l'animal de compagnie peut représenter de nos jours un vestige de notre ruralité ancienne perdue. Ce n'est qu'au milieu du XVII^{ème} siècle que sont apparues les premières réflexions philosophiques sur le bien-être animal et au XIX^{ème} siècle que sont apparues les premières sociétés de protection animale. En France, la première réglementation concernant l'animal est la loi Grammont (1850), proposée à l'assemblée nationale par le député Grammont qui s'offusquait des flagellations que les palefreniers imposaient aux chevaux pour les faire avancer dans les rues étroites de Paris. Cette loi qui édictait « de ne pas faire mal à un animal en public », a été marquante puisqu'elle prévoyait pour la première fois des sanctions pour « les personnes ayant fait subir publiquement des mauvais traitements aux animaux ». Il fallut attendre près d'un siècle pour voir l'adoption d'une loi (loi du 10 juillet 1976) soulignant le fait que les animaux sont des êtres sensibles subissant contraintes et souffrances imposées par l'Homme.

Cette première loi a donné les fondements de la plupart des textes réglementaires ultérieurs, encadrant nos pratiques par rapport aux animaux en général (articles L214-1 et 3 et articles L215-6 et 7 du Code rural) et en particulier ceux concernant l'expérimentation animale qui relèvent aussi de la transposition de la Directive 86/609 du Code rural, Décret 87/848 du 19 octobre 1987 modifié par Décret 2001-464 du 29 mai 2001 et par Décret 2005264 du 22 mars 2005, insérés dans la partie réglementaire du Code rural (article R214-87 à R 214-130, arrêtés du 19 avril 1988), qui soulignent tous le souhait d'encadrer les pratiques liées à l'expérimentation animale.

³ Le statut juridique de l'animal a été révisé en 2014 :

<http://www.spa.asso.fr/actualites/statut-juridique-de-lanimal-une-nouvelle-etape-est-franchie>

Ces critères conduisent à éviter l'usage des animaux chaque fois que cela est possible. Lorsque cet usage ne peut être évité et dans les cas où il y a souffrance ou détresse animale, il convient de définir le point limite de souffrance ou détresse animale en se basant sur des principes énoncés et formalisés par W.M.S Russell et R.L. Burch, dans leur ouvrage « The principles of Human Experimental Technique » publié en 1959. Cet ouvrage fait référence à un principe, aujourd'hui connu sous le nom de règle des trois R pour « *Replace, Reduce, Refine* » : Remplacer, Réduire et Raffiner (cf. chapitre Généralités, les 3R).

Les recommandations édictées dans cet ouvrage sont d'abord passées inaperçues avant de servir de base à de nombreux textes réglementaires. Elles permettent aujourd'hui la mise en place d'une réflexion sur l'expérimentation animale et les méthodes alternatives.

► **L'extrapolation des résultats des études à l'Homme ou l'animal : une prédictivité imparfaite**

Les études à visée réglementaire, généralement en phase de développement des produits (médicaments, produits phytosanitaires, etc.), sont l'objet de procédures standardisées et validées dont l'objectif est de permettre l'évaluation des dangers ou effets adverses des molécules et /ou produits formulés par des Comités experts et les agences de sécurité sanitaire à l'échelle nationale et à l'échelle européenne. Ces études sont soumises à contrôles pour évaluer les données obtenues. Dans ce cas, les objectifs sont généralement d'identifier le danger lié à la molécule testée et de participer à l'évaluation du risque pour l'Homme ou l'organisme vivant qui seront exposés à cette molécule. Les résultats obtenus doivent donc permettre d'établir une « carte d'identité » du danger de la molécule (identification des organes cibles, pouvoir mutagène et cancérigène, effets sur les fonctions de reproduction) mais aussi de définir une dose sans effet toxique ou une relation dose/effet. Cette dose sans effet toxique (ou sans effet inacceptable) sera un des éléments d'appréciation du risque encouru par l'Homme exposé au produit et sert de base au calcul des seuils d'exposition réglementaire comme la DJA (dose journalière admissible) dans le cas des produits phytosanitaires. Cette dose sans effet participe aussi à la définition de la posologie d'emploi des médicaments chez l'Homme.

La transposition à l'Homme des résultats obtenus en toxicologie réglementaire chez les animaux d'expérimentation est établie dans un grand nombre de cas. Par exemple, les rhabdomyolyses observées avec la cérivastatine chez les patients traités et qui ont abouti au retrait du médicament du marché avaient été clairement identifiées chez l'animal. Pour autant, elle n'est pas pertinente dans certains autres cas (par exemple rofecoxib : VIOXX®, anticorps monoclonal TGN1412, effets cardiaques du trastuzumab Herceptin®). Cela est dû à diverses raisons qui peuvent d'ailleurs parfois interagir entre elles. A titre d'exemples, certaines espèces sont peu sensibles ou au contraire extrêmement sensibles à certains agents toxiques (ex : tératogènes comme la thalidomide). Il faut aussi mentionner les aspects idiosyncrasiques comme le polymorphisme génétique des enzymes de métabolisation ou le déterminisme génétique des réponses immunitaires qui ne sont pas prévisibles par l'expérimentation animale et sont à l'origine de nombreux retraits du marché de médicaments. Dans d'autres cas, il peut s'agir de différences dans les mécanismes biologiques présents chez l'animal et chez l'Homme. Dans ce dernier cas, la mise en place d'études pertinentes utilisant des cellules humaines et animales permettraient probablement de mieux sélectionner l'espèce animale la plus appropriée.

Dès lors les questions de la prédiction du niveau de risque pour l'Homme, et donc de la définition d'un seuil acceptable d'exposition sont posées. La manière actuelle de résoudre cette problématique est de définir un facteur de sécurité qui est le rapport entre la dose sans

effet toxique chez l'animal et la dose à laquelle on estime pouvoir exposer l'Homme sans danger.

Enfin, il faut souligner qu'en ce qui concerne le médicament humain les essais chez l'animal sont toujours suivis d'une phase d'essai de plus en plus extensive chez l'Homme. Cette précaution n'empêche pas les accidents après cette phase pour plusieurs raisons. Tout d'abord l'extension des populations humaines (7 milliards d'individus), la variabilité génétique extrême de ces populations, l'existence d'isolats génétiques très différenciés et enfin les contextes comportementaux, sanitaires, environnementaux extrêmement variés de ces populations. Il est donc important de rappeler que ce n'est pas l'absence de pertinence des modèles animaux qui conduit aux rares accidents postérieurs à la phase d'essai chez l'homme. La transposition de l'Homme à l'Homme, est, elle aussi une question à poser.

Par ailleurs, la perception du risque est différente pour un médicament d'usage humain ou vétérinaire, pour lequel on peut accepter le risque si le rapport bénéfice/risque est favorable, et pour un produit cosmétique ou un produit aboutissant dans l'environnement, pour lequel l'acceptation d'un risque peut être sociologiquement inacceptable.

► **L'application de méthodes alternatives**

Dans le cas des études visant à définir la sécurité d'emploi ou les limites de l'exposition à une molécule donnée, plusieurs types de méthodes alternatives sont déjà utilisables. En ce qui concerne le remplacement, l'application du règlement 1223/2009 sur les cosmétiques a conduit à la substitution de plusieurs essais⁴.

En ce qui concerne la réduction, des approches visant à réduire le nombre d'animaux sont déjà en évaluation pour une acceptation réglementaire. C'est par exemple le cas du rLLNA (reduced Local Lymph Node Assay) dont la prédictivité est au moins équivalente à celle du LLNA classique avec deux fois moins d'animaux employés. L'utilisation de modèles animaux humanisés doit aussi être développée comme ceux comportant certains Cytochromes P450 humains connus pour jouer un rôle majeur dans la métabolisation des xénobiotiques. Le développement de biomarqueurs spécifiques et de méthodes non-invasives d'exploration devraient permettre une réduction significative du nombre d'animaux dans les études de toxicologie.

Parmi les tests toxicologiques *in vitro* ou *ex vivo* développés en remplacement de l'expérimentation animale, les tests de mutagenèse sont depuis longtemps employés comme tests réglementaires et emploient des procédures standardisées et validées. En pharmacologie de sécurité, le test « patch clamp » hERG (modèle cellulaire pour prédire des effets cardiotoxiques) est un bon exemple de test développé à partir de la recherche fondamentale et appartenant maintenant à une batterie de tests réglementaires recommandés. Pour d'autres tests, les procédures sont moins bien précisément établies et les résultats des essais dépendent souvent du niveau d'expertise de chaque laboratoire et de la pertinence des modèles cellulaires et des modèles animaux utilisés pour mettre en place les modèles cellulaires. Néanmoins, il faut souligner l'importance de ces approches dans la compréhension des mécanismes d'action toxiques chez l'Homme qui, souvent, aboutissent à une réduction notable du nombre d'études chez l'animal. Dans ce cas, l'acceptabilité réglementaire ne sera pas l'objectif premier pour le développement de ces méthodes car celles-ci ne seront pas employées en substitution à l'animal de laboratoire.

⁴ https://EURL_ECVAM.jrc.ec.europa.eu/EURL_ECVAM-status-reports/files/EURL_ECVAM-report-cosmetics-2013

Mais leur acceptabilité dans la communauté scientifique doit être un objectif ce qui est déjà le cas pour les tests employés très en amont dans le développement des produits de santé (tests de mutagenèse miniaturisés, Omics, etc.) L'utilisation de plateformes (Imagerie-puces à cellules, etc.) labellisées (IBISA, etc.) devrait faciliter la standardisation et l'évaluation de la reproductibilité de nouveaux tests développés au sein de différents laboratoires.

Dans le domaine de la recherche appliquée et de la recherche fondamentale, et à la différence des études de sécurité, les procédures ne font pas l'objet d'une standardisation, certaines de ces études pouvant avoir pour objectif de définir de nouvelles approches complémentaires. Dans ces situations, les évaluations des effets thérapeutiques et des éventuels effets indésirables sont effectuées par des Comités experts *ad hoc* à partir de l'ensemble des connaissances disponibles. En situation extrême, comme l'utilisation de nouvelles voies thérapeutiques (thérapie cellulaire, thérapie génique, etc.) la prédictivité des études ne peut être établie que de façon rétrospective lorsque le premier essai chez l'Homme a été réalisé. Fréquemment, après ces premiers essais, de nouvelles études sont entreprises tant *in vivo* chez l'animal qu'*in vitro* afin d'améliorer les modèles expérimentaux existants.

Dans ce cas, les contraintes sont moins fortes d'un point de vue réglementaire mais devront faire l'objet de consensus dans la communauté scientifique quant à leur extrapolation à la situation humaine.

In fine, l'expérience acquise montre que Remplacement, Réduction et Raffinement ont déjà été possibles.

L'EXPERIMENTATION ANIMALE PARMIS LES OUTILS D'INVESTIGATION DU VIVANT

L'utilisation de « modèles animaux » fait partie des outils expérimentaux de l'investigation du vivant avec l'étude expérimentale chez l'Homme, les études sur les tissus, cellules et molécules biologiques isolées.

Elle se situe aussi aux côtés des approches observationnelles (clinique, épidémiologie) chez l'Homme ou l'animal. Aujourd'hui, elle se place de plus en regard des méthodes de modélisation mathématique du vivant.

Par nature, l'expérimentation animale est centrée sur l'étude de réponses intégrées au sein de l'organisme qui impliquent de nombreuses interactions entre cellules ou tissus, et organes entre eux. Elle est un des éléments de compréhension du vivant, complémentaire des études expérimentales réalisées sur des cellules et des organes isolés ou des observations dont tous les paramètres ne sont pas accessibles (ex. patients humains, etc.).

Une vision statique de l'approche expérimentale serait trompeuse, car celle-ci est en perpétuelle évolution. Ainsi, les développements scientifiques, en particulier les progrès récents de la biologie moléculaire, de l'imagerie et les techniques de « post-génome⁵ » ou « Omics » conduisent à de nouvelles formes d'investigation sur le vivant. De plus, les modèles animaux eux-mêmes évoluent, notamment avec l'usage d'animaux génétiquement modifiés, pour modéliser des mécanismes physiopathologiques plus proches de ceux de l'Homme et/ou, pour faciliter l'étude d'une pathologie.

⁵ Etude du rôle des gènes, de leurs interactions au sein d'un organisme et du lien entre gènes et phénotype.

► **Pour la recherche fondamentale en physiologie animale et humaine et pour l'étude des maladies animales et humaines**

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 du long terme. A ce titre elle reste une composante non remplacée de la biologie fondamentale. L'expérimentation animale reste également un outil important de la recherche médicale moderne sur de nombreuses pathologies (maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, maladies infectieuses et développement de vaccins, maladies métaboliques comme le diabète, etc.). Elle sert également à développer les nouvelles techniques chirurgicales (greffes, microchirurgie ou neurochirurgie). Les questions posées par la recherche sont fondamentales pour l'identification des mécanismes biologiques qui permettent aux organismes de s'adapter aux variations des conditions environnementales et aux perturbations internes en situations physiologiques et par voie de conséquence pathologiques.

Les progrès de la médecine à un moment ou à un autre du processus de la découverte, s'appuient généralement sur les résultats d'expérimentations animales. On peut signaler que plus de 70 prix Nobel de médecine et de physiologie ont récompensé l'acquisition de connaissances obtenues à partir de l'expérimentation animale. Cette expérimentation tient donc une place aujourd'hui très importante dans le processus de la découverte scientifique en biologie et médecine. Des Comités européens comme le SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risk) n'envisagent pas la possibilité de s'affranchir de ces modèles dans l'état actuel des connaissances. Même dans cette hypothèse, on rappellera que l'expérimentation peut être « Raffinée », par des méthodes comme celles utilisées dans l'étude du mouvement et du comportement qui ne comportent ni peine ni sacrifice. L'utilisation de l'expérimentation animale dans le domaine de la recherche est ainsi l'enjeu majeur des discussions actuelles, par contraste avec celui d'il y a 10 ans.

► **Pour prédire le risque lié à l'exposition aux agents chimiques, physiques ou biologiques**

Aujourd'hui, l'un des grands défis de santé publique est la prévention des éventuels effets néfastes liés à une exposition à un ou plusieurs agents chimiques, physiques ou biologiques présents dans notre environnement général, domestique ou professionnel. Cette préoccupation de prévention s'applique également aux produits destinés à la santé animale ainsi qu'aux produits de traitement des végétaux. En (éco) toxicologie, l'expérimentation animale vise en premier lieu à prédire les dangers pour savoir si l'on doit autoriser des substances ou pour permettre l'élaboration de mesures de prévention efficaces lors de l'autorisation des substances et de leur condition d'emploi.

Les agents chimiques

Les agents xénobiotiques sont des molécules, étrangères à un organisme donné et comprennent les produits chimiques, liés à notre mode de vie, les polluants et contaminants mais aussi les agents à but thérapeutique (substances médicamenteuses) ainsi que les produits cosmétiques, biocides et phytosanitaires.

Les agents physiques

Il s'agit des champs électromagnétiques produits par exemple par des antennes ou des radars, des vibrations, du bruit, des rayonnements ionisants et non ionisants.

Les agents biologiques

Sont classés dans les agents biologiques les agents présentant un risque infectieux comme les virus, les bactéries, les champignons, les parasites, mais aussi les médicaments biologiques tels que les vaccins, les produits biotechnologiques, les toxines (mycotoxines, phycotoxines), les Organismes Génétiquement Modifiés utilisés en agriculture ou pour les nouvelles thérapies.

► **Pour le développement de médicaments**

On peut considérer qu'une partie des expérimentations associées au développement de médicaments relèvent de la recherche sur les pathologies, et y associer les études sur l'efficacité des molécules. Il reste cependant tout un domaine, celui de la maîtrise des effets indésirables. Lors du développement de médicaments humains ou vétérinaires, des effets indésirables sont identifiés et l'anticipation des dangers sert alors à écarter des molécules inacceptables ou à établir la balance « bénéfice/risque » pour permettre une bonne utilisation.

Les expérimentations animales occupent aujourd'hui une place centrale dans les démonstrations. Ces études ont pour objectif de renseigner sur :

- La nature des effets toxiques résultant de diverses conditions d'exposition rigoureusement contrôlées (variété des niveaux, des durées, des voies d'exposition, etc.),
- Les doses ayant induit ces effets toxiques,
- Les mécanismes potentiels d'un effet suspecté chez l'Homme.

Plus de 50 ans d'études expérimentales de toxicité ont ainsi permis d'améliorer considérablement les connaissances sur les mécanismes d'action d'un grand nombre de substances.

Aujourd'hui, les études toxicologiques ont recours à un ensemble diversifié de modèles expérimentaux :

- Les tests *in vivo* réalisés directement sur l'animal,
- Les tests *ex vivo* effectués sur un tissu ou un organe ou partie d'organe isolé,
- Les tests *in vitro*, ayant généralement recours à l'utilisation de cellules isolées d'origine animale ou humaine, ou d'extraits cellulaires ou de protéines,
- Les tests *in silico* permettant d'analyser, grâce à des logiciels informatiques, les propriétés recherchées ou indésirables d'une substance en fonction de sa structure ou de sa réactivité,
- Les approches intégratives combinant l'ensemble des tests précités.

Bien que des progrès considérables dans la connaissance aient été obtenus depuis 50 ans, des évolutions d'ordres éthique, scientifique et économique questionnent la place centrale de l'expérimentation animale.

► **Pour la production et le contrôle de la qualité des produits de santé animale et humaine, pour les denrées alimentaires**

Les crises sanitaires qu'ont connues la France et les pays européens dans le domaine des produits de santé et des produits alimentaires montrent la nécessité de mettre en œuvre un contrôle de la production et de la qualité de ces produits destinés à l'Homme et à l'animal. Nous citerons comme exemple, l'affaire du Stalinon entre 1953 et 1958, celles plus proches de l'hormone de croissance (années 1980) et du sang contaminé (1991) dans le domaine du médicament (même si bien d'autres problèmes que celui du contrôle *stricto sensu* ont joué), la maladie de « la vache folle » et la *listeria* pour les produits alimentaires.

Cas du médicament :

Pour tout médicament, le fabricant doit s'assurer, à toutes les phases de recherche et de développement, de la qualité, de l'efficacité et de la sécurité de chaque lot de produit destiné à être administré à un patient. Alors que les contrôles de la qualité et la sécurité des médicaments chimiques s'appuient essentiellement sur des essais n'utilisant pas l'animal,

(méthodes physico-chimiques, méthodes microbiologiques), il n'en est pas de même pour les médicaments d'origine biologique. En effet, de par la nature biologique du principe actif, les médicaments biologiques (vaccins, sérums, toxines), présentent une variabilité intrinsèque qui impose souvent la mise en œuvre de contrôles dont les tests d'activité et de sécurité qui sont très consommateurs d'animaux, essentiellement des rongeurs.

Cas des produits alimentaires :

Une méthode physico-chimique appliquée au dosage des biotoxines lipophiles dans les aliments a été validée aux niveaux national et communautaire⁶. Il s'agit d'une technique séparative chromatographique couplée à la spectrométrie de masse. Cette méthode vient en complément des bioessais réalisés sur la souris qui sont toujours nécessaires pour la détection des toxicités atypiques comme cela est le cas pour les biotoxines marines des mollusques bivalves.

A la liste des méthodes possibles en toxicologie on peut ici ajouter des essais sur bactérie et des méthodes de chimie analytique.

► **Pour l'enseignement**

L'expérimentation sur les animaux vertébrés est utilisée en enseignement supérieur lors de la formation des futurs chercheurs et techniciens dans le cadre de leur formation initiale. Ces enseignements ont recours aux méthodes de substitution que sont les simulations informatiques, les méthodes *in vitro* ou encore l'utilisation de mannequins de petits animaux de laboratoire. Cependant, l'usage de ces méthodes semble encore relativement limité.

Par ailleurs, un enseignement sur l'expérimentation animale est donné dans les formations destinées aux acteurs de l'expérimentation animale selon leur niveau d'intervention sur l'animal (chercheur, technicien, zootechnicien) en conformité avec l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels, des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins expérimentales et de fonctionnement des établissements d'expérimentation animale.

⁶ Elle s'applique aux 4 familles de toxines réglementées ; EUHarmonized Standard Operating Procedure for determination of lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS, (JO de l'union européenne L6 du 11/01/2011).
(http://www.aesan.msps.es/CRLMB/docs/docs/metodos_analiticos_de_desarrollo/EU-HarmonisedSOP-LIPO-LCMSMS_Version4.pdf).

LES STATISTIQUES DE L'EXPERIMENTATION ANIMALE ⁷

La dernière enquête publiée par la Commission Européenne (2013) relative à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques permet d'estimer le nombre d'animaux utilisés dans les différents pays de la Communauté Européenne.

En 2011, il a été utilisé **11,5 millions d'animaux en Europe** (dont 2,2 millions en France). Les rongeurs⁸ représentaient 80% du total (79,48% en France) dont les souris 60,96%. Les carnivores représentaient 0,25% du total (0,18% en France) et les primates non humains 0,05% (0,08% en France).

Les trois principaux domaines d'utilisation des animaux sont les études en **biologie fondamentale (46,1%)**, la recherche et développement en médecine humaine ou vétérinaire (18,8%) et la production et le Contrôle Qualité des médicaments humains (10,97%).

Dans quasiment la moitié des cas (47,11%), les animaux ont été utilisés pour la production et le Contrôle Qualité afin de répondre simultanément à plusieurs réglementations (européenne, nationale, internationale) et dans un tiers des cas (35,9%) pour répondre à la réglementation européenne uniquement.

Les études de toxicologie et d'évaluation de sécurité représentent 8,75% du nombre total d'animaux utilisés. Environ 40% des études de toxicologie concernent les médicaments humains et vétérinaires ou les produits dentaires ; quant aux produits cosmétiques, ils représentent 0,24% (0,00021% du nombre total). Les études de toxicité aiguë et subaiguë représentent 47,5% des animaux utilisés en toxicologie. Une analyse approfondie des nombres d'animaux utilisés pourrait permettre de définir des priorités en termes de méthodes alternatives, cependant ces statistiques comportent des imprécisions (catégorie 'autres' représentant 22,06% des études de toxicologie) ou un émiettement des données (catégorie 'étude aiguë et subaiguë' pour 'les produits domestiques' représentant 238 animaux soit 0,05% du total de la catégorie) les rendant peu utilisables dans ce but.

En France, environ 10% du nombre total de rongeurs utilisés ont été euthanasiés comme source de matériel biologique pour les méthodes alternatives (400 000 animaux).

Des statistiques plus récentes sont disponibles en France sur le site du ministère de la recherche (<http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/cid70613/enquete-statistique-sur-l-utilisation-des-animaux-a-des-fins-scientifiques.html>). Elles montrent une décroissance du nombre d'animaux utilisés (1,8 millions d'animaux), mais il s'agit d'une enquête rétrospective sur 2014 selon un format demandé par l'Union Européenne et différent de l'enquête qui portait sur 2011. Sont notamment exclus les animaux utilisés pour des prélèvements d'organes et de tissus à des fins de méthodes alternatives. Sont aussi regroupés, avec la toxicité et le contrôle, et avec l'efficacité, la mise au point et la production de médicament pour l'homme, les animaux, et pour les denrées alimentaires et autres produits, ce qui aboutit à une catégorie importante (52%) mais difficile à interpréter.

⁷Septième rapport sur les statistiques concernant le nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales et à d'autres fins statistiques dans l'Union Européenne. Commission des communautés européennes. COM (2013) 859 final.

⁸ Données incluant les lagomorphes.

LES METHODES
et
LE CADRE DE LEUR DEVELOPPEMENT

I - LES MÉTHODES ALTERNATIVES « EN » EXPÉRIMENTATION ANIMALE

1. LA DEFINITION : LES TROIS R, LE REMPLACEMENT, LA REDUCTION ET LE RAFFINEMENT

Le bien-être animal ainsi que la douleur⁹ et la détresse que les animaux utilisés à des fins scientifiques peuvent ressentir sont depuis longtemps une préoccupation du grand public et de la communauté des chercheurs sensibles à ces questions. Ce sont ces préoccupations, combinées à l'utilisation accrue des animaux en recherche fondamentale et appliquée, qui ont motivé W. M. S. Russell et R. L. Burch à examiner comment une telle utilisation des animaux était gérée. Dans leur monographie *The Principles of Humane Experimental Technique* [les principes d'une expérimentation conforme à l'éthique], dont la première parution remonte à 1959, ces auteurs proposent le principe des Trois R. Les Trois R signifient remplacement, réduction et raffinement. Depuis une cinquantaine d'années, ce principe des Trois R est une référence largement reconnue et appliquée dans les études nécessitant l'utilisation d'animaux, même si elle n'est pas la seule, et ce, dans de nombreux pays du monde.

Le terme « alternatives » a été inventé en 1978 par l'éminent physiologiste David Smyth dans son ouvrage *Alternatives to Animal Experiments* [alternatives aux études expérimentales sur les animaux]. Ce mot est utilisé pour décrire toute modification aux procédures scientifiques établies qui a pour résultat le remplacement de l'utilisation des animaux, la réduction du nombre d'animaux utilisés ou le raffinement des techniques qui peuvent réduire la douleur/la détresse chez les animaux. Par conséquent, le terme de Smyth, « méthodes alternatives », recouvre les mêmes domaines/sujets que les « Trois R » de Russell et Burch.

L'éthique telle qu'appliquée par le CCPA (Conseil Canadien de Protection des Animaux) est fondée sur la définition de la notion « d'Alternatives » proposée par Smyth, c'est-à-dire du remplacement, de la réduction et du raffinement. En France, les deux premiers R, remplacement et réduction, sont inscrits dans la loi du 10 juillet 1976 (article L214-3 du Code rural), et vont complètement dans le sens de l'évolution de la recherche scientifique. Le troisième R, raffinement, trouve également des réponses dans l'innovation des méthodes scientifiques mais représente aussi le quotidien des acteurs de l'expérimentation animale ; l'éthique appliquée à l'expérimentation animale rejoint également parfaitement une notion qui n'apparaît pas directement dans le principe des 3R, le bien-fondé scientifique associé aux bonnes pratiques scientifiques. La responsabilisation de l'expérimentateur, fondamentale pour une application efficace de l'éthique, pourrait devenir le quatrième R.

Les **alternatives de remplacement** désignent les méthodes qui évitent ou remplacent l'utilisation des animaux dans un domaine (où il était jusqu'alors nécessaire) de les utiliser. Ces alternatives comprennent à la fois les remplacements complets/absolus (c'est-à-dire le remplacement des animaux par des systèmes *in vitro* (cultures cellulaires) ou *in silico* (modèles biomathématiques) et les remplacements relatifs (c'est-à-dire le remplacement d'animaux dont la sensibilité est considérée comme élevée (les vertébrés), par un animal dont le potentiel de perception de la douleur est, selon les données scientifiques actuelles, significativement moins élevé (certains invertébrés).

⁹ La définition de la douleur chez l'Homme a été adoptée par l'IASP (Association internationale pour l'étude de la douleur) et a ensuite été modifiée par des vétérinaires anglais afin de proposer une formulation plus adaptée aux capacités des animaux : « expérience sensorielle et émotionnelle aversive, représentée par la « conscience » que l'animal a de la rupture ou de la menace de rupture de l'intégrité des tissus ».

Les **alternatives de réduction** désignent toutes les stratégies dont le résultat se traduit soit par une diminution dans le nombre d'animaux utilisés tout en obtenant suffisamment de données pour répondre aux questions posées dans l'étude, soit par une optimisation de l'utilisation des animaux qui permet alors d'obtenir plus d'informations utiles à partir d'un même nombre d'animaux, sans pour autant augmenter la contrainte pour les animaux utilisés.

Les **alternatives de raffinement** (parfois appelé optimisation) désignent les modifications apportées à l'élevage ou aux procédures expérimentales afin de réduire la douleur et la détresse, et d'améliorer le bien-être des animaux utilisés pendant toute leur durée de vie tout en obtenant un niveau élevé d'informations pertinentes à partir de la même procédure.

2. LES METHODES ALTERNATIVES (3R) DISPONIBLES, LEUR PERTINENCE ET LEURS LIMITES

LA SUBSTITUTION OU LE REMPLACEMENT

Il existe plusieurs approches alternatives à l'expérimentation animale : les méthodes *in vitro* et *in silico* (substitution absolue) et les méthodes *ex vivo* (substitution relative). Certains incluent également le remplacement d'espèces sensibles (mammifères) par des invertébrés.

La liste des techniques décrites ci-dessous ne prétend pas être exhaustive mais fait un état des lieux des principales approches dans le domaine de la substitution.

► Les méthodes dites *in vitro* et *ex vivo* sont essentiellement expérimentales

Le terme **ex vivo** est attribué aux méthodes qui ont pour système d'essai des tissus d'animaux provenant d'abattoirs, ou de laboratoires (création de banques de tissus ou de sang) ou des tissus humains (« prélèvements » chirurgicaux par exemple).

Exemple de test *ex vivo*, la ligne directrice n°437 de l'OCDE pour l'identification de substances corrosives ou très irritantes pour l'œil.



Cornée bovine placée sur un « porte cornée » à 2 compartiments antérieur et postérieur respectivement en contact avec les faces épithéliales et endothéliales de la cornée. L'évaluation du danger potentiel d'un produit chimique testé pour l'œil est mesurée par la propension du produit chimique à provoquer une opacité et une perméabilité accrue sur une cornée bovine isolée. Les effets toxiques pour la cornée sont mesurés par : - la diminution de la capacité de transmission de la lumière (opacité) et - l'augmentation du passage de la fluorescéine sodique (perméabilité).

Les méthodes *in vitro* couvrent un grand nombre de techniques dont :

- Les méthodes physico-chimiques, ou *in chemico*

Ex : la ligne directrice 442CL de l'OCDE ou « direct peptide reactivity assay (DPRA) » est préconisée pour prédire le potentiel sensibilisant d'une substance chimique. Cette méthode est basée sur l'utilisation de modèles peptidiques de synthèse contenant soit de la lysine, soit de la cystéine. Le taux de déplétion de ces deux acides aminés dosés par CLHP, permet de classer les substances dans l'une des 4 classes de réactivité selon le modèle de prédiction.

- Les méthodes biochimiques

Parmi les méthodes biochimiques, le test le plus répandu est celui de la compétition de liaison pour un ligand radiomarqué ou fluorescent au récepteur nucléaire, communément appelé « test de binding ». La source de récepteur peut être un extrait de

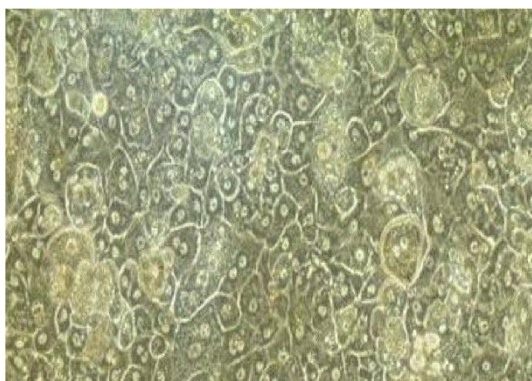
tissu, de cellules, ou une protéine recombinante. Comme exemple, on peut citer le test ERBA (*Estrogen Receptor Binding Assay*). Ce test qui utilise le récepteur ER α issu de l'utérus d'agneau, est actuellement en cours de validation par l'ECVAM (UE) et l'EPA (USA). Il permet d'évaluer l'affinité d'un perturbateur endocrinien potentiel pour le récepteur nucléaire dans des échantillons biologiques.

- Les méthodes utilisant des bactéries ou levures

L'un des exemples les plus anciens est le test d'Ames, test réglementaire qui permet d'évaluer le potentiel mutagène d'une substance ou d'un mélange en utilisant la bactérie *Salmonella Typhimurium* (OCDE n°471). D'autres tests plus récents peuvent être cités comme le test YES –YAS de la société Xenometrix, basé sur l'utilisation de la levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*) génétiquement modifiée et qui possède un gène exprimant le récepteur humain aux œstrogènes hER α , dit test YES (*Yeast Estrogen Screen*) ou le récepteur aux androgènes hAR, dit test YAS (*Yeast Androgen Screen*) couplé à un gène rapporteur. Les levures ont la capacité, par une suite de réactions enzymatiques, de produire la β -galactosidase dont la réaction enzymatique permet de mesurer les effets par une lecture en spectrométrie.

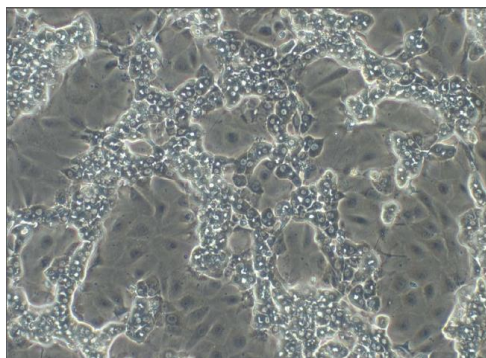
- Les modèles cellulaires représentatifs de tissus

Ex 1 : les modèles hépatiques : - les cultures primaires d'hépatocytes sont toujours considérées comme le modèle de choix pour l'étude du métabolisme *in vitro* des xénobiotiques - la lignée cellulaire épithéliale HepaRG, issue d'un carcinome hépatocellulaire humain est capable d'effectuer un programme quasi complet de différenciation hépatocytaire. Une fois différenciée, elle est capable de maintenir de nombreuses fonctions spécifiques hépatiques pendant plusieurs semaines. Elle est de fait un modèle de choix pour l'étude des effets toxiques, à la fois aigus et chroniques. La lignée HepaRG est capable de bioactiver un certain nombre de promutagènes en métabolites génotoxiques.



Hépatocytes humains en culture primaire.

Les hépatocytes ont été isolés à partir d'un fragment de pièce de lobectomie prélevée sur un malade présentant une métastase hépatique d'un carcinome colique primaire. Les cellules ont été mises en culture monocouche sur collagène, en présence d'un milieu de culture chimiquement défini permettant le maintien sur plusieurs semaines des marqueurs phénotypiques hépatiques. La photographie présentée (microscope à contraste de phase, grossissement x250) a été prise trois jours après mise en culture. Ce modèle cellulaire est utilisé par exemple, pour l'étude des interactions médicamenteuses ou pour l'étude du métabolisme hépatique des médicaments.



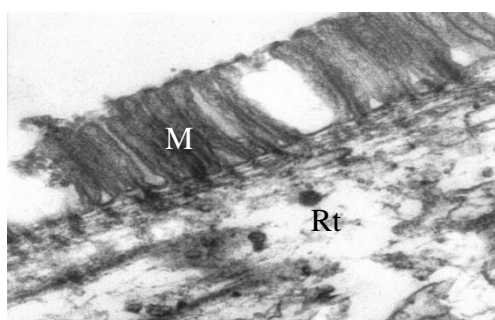
Lignée cellulaire hépatique différenciée HepRG.

La lignée HepaRG a la capacité de conserver ses fonctions différenciées pendant plusieurs semaines de culture McGill M.R & al: HepaRG Cells : A human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity *Hepatology*, 53, février 2011

Ex 2: Le modèle CaCo2

Cette lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale a été isolée d'un adénocarcinome colique. Dans certaines conditions de culture, ces cellules ont la capacité de se différencier spontanément en cellules intestinales polarisées pour former une barrière intestinale fonctionnelle en termes morphologiques, physiologiques et métaboliques.

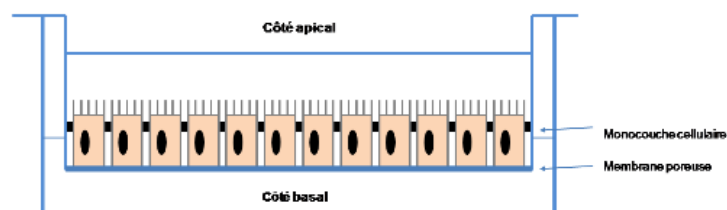
Ce modèle est utilisé pour prédire la biodisponibilité d'un composé d'intérêt, la comparaison de différentes formes galéniques, pour l'étude des paramètres d'absorption etc.



Culture cellulaire CaCo2 observée au MET.

Structure et implantation des microvillosités (M) constituant la bordure en brosse (réseau terminal constitué notamment de filaments d'actine (Rt) – Gx20000

Cette lignée cellulaire dérivée d'un carcinome de colon humain a la capacité de se différencier pour acquérir la morphologie (bordure en brosse du pôle apical) et la fonctionnalité de l'entérocyte (cellule jouant un rôle clé dans l'absorption intestinale). L'une des applications de ce modèle est l'étude de l'absorption intestinale *in vitro* des principes actifs des médicaments.



Ex 3 : Les cellules humaines d'origine mammaire MCF-7 issues d'un épanchement pleural riches en récepteurs α et dont la croissance est dépendante de la présence d'oestrogènes permettant de détecter un potentiel effet oestrogénique (test E-Screen) ou encore des tests d'activation transcriptionnelle sur des lignées humaines (lignée Hela par ex) stablement transfectées permettant de détecter une activité transcriptionnelle (agoniste ou antagoniste) de xenoestrogènes (OECD 455).

- Les méthodes basées sur la réponse immunitaire sur systèmes cellulaires ou sur les propriétés antigéniques d'un médicament.

Les méthodes *in vitro* en immunotoxicologie permettent d'étudier les effets immunosuppresseurs ou les effets immunoactivateurs.

Pour l'étude de la mesure des effets immunosuppresseurs de produits chimiques de santé ou non, les principaux tests sont les suivants :

Ex 1 : Mesure de l'activité proliférative des lymphocytes T ou des lymphocytes B via l'usage d'activateurs poly-clonaux tels que la concavaline A ou la phytohémagglutinine ou bien via l'usage d'anticorps spécifiques anti-CD3 et anti-CD28.

Des splénocytes de rongeurs ou des cellules mononuclées du sang périphérique humain peuvent être utilisés.

Ex 2 : Mesure de la fonction natural killer (NK) : ce sont des tests *ex vivo* dans lesquels les splénocytes ou le sang obtenus à partir d'animaux sont traités avec le composé d'intérêt. Les préparations cellulaires sont co-incubées avec des cellules cibles marquées au ⁵¹Cr. De nouvelles méthodes sans l'usage de radioéléments peuvent être utilisées de manière adéquate si validées. Différents rapports effecteurs de cellules doivent être évalués pour chaque test afin d'obtenir un niveau suffisant de cytotoxicité et générer une courbe.

Ex 3 : Mesure de la fonction de phagocytose (macrophages) : ce test mesure la fonction des macrophages exposés *in vitro* au produit à tester ou de macrophages obtenus à partir d'animaux traités (test *ex-vivo*). L'activité de la phagocytose est ensuite évaluée par cytométrie en flux.

Pour l'étude de la mesure des effets allergiques de produits chimiques, l'activation des cellules dendritiques différenciées à partir de monocytes permet de mimer la première étape de l'activation des cellules présentant l'antigène (CPAg) au cours de l'allergie aux produits chimiques.

Il existe à ce jour un projet de ligne directrice à l'OCDE pour l'évaluation du pouvoir sensibilisant "Test Guideline on the human-Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitisation". Ce test est réalisé dans la lignée THP1, *lignée* des cellules monocytaires humaines. La mesure de deux marqueurs membranaires (CD54 & CD86) en réponse à des molécules chimiques est effectuée par cytométrie en flux. Ce sont ces mêmes marqueurs, qui sont induits au cours de l'activation des cellules dendritiques dans la peau au cours des allergies cutanées.

- **Les méthodes alternatives basées sur des cultures cellulaires** (lignées ou cellules isolées à partir d'organes ou de tissu – culture primaire d'un type cellulaire isolé – des co-cultures et des modèles de tissus reconstruits à partir de types cellulaires différents) sont les plus utilisées. Leur intérêt principal est d'offrir la possibilité d'utiliser des cellules humaines (même si les cellules animales le sont également du fait de leur approvisionnement plus facile), ce qui permet a priori une extrapolation plus pertinente des résultats à l'Homme.
- **Les modèles tridimensionnels tels que les tissus et les modèles reconstruits**, se rapprochent physiologiquement plus du modèle animal *in vivo* que les cultures cellulaires, du fait d'une meilleure approche de l'organisation des interactions cellulaires. Mais la réalisation des cultures primaires et des modèles reconstruits humains nécessite une certaine technicité qui les rend difficiles à implanter et à maintenir, sans compter les coûts de développement et de fonctionnement. Par ailleurs, les sources d'approvisionnement en tissus humains sont limitées, leur variabilité (antécédents des donneurs) difficile à maîtriser et à l'origine de biais, et leur collecte nécessite l'accord des Comités d'éthique « humains ». Les résultats obtenus doivent bien sûr être interprétés au regard des variabilités inter-individuelles¹⁰ mais l'intérêt est d'avoir une proximité à des cellules ou tissus cibles humains dont les réponses physiologiques

¹⁰ Cette remarque s'applique de la même façon à l'expérimentation animale mais à un moindre degré compte-tenu de la standardisation des modèles animaux.

peuvent être différentes de celles de l'animal. En cumulant ces données *in vitro* et les données obtenues sur un organisme animal entier, on augmente la prédictivité des effets chez l'Homme. Enfin, il existe un grand nombre de types de cellules humaines, généralement bien caractérisées et relativement stables dans des conditions de conservation et de culture bien définies ce qui permet une meilleure reproductibilité des résultats. Il est ainsi important de préciser les passages lorsque l'on utilise des lignées cellulaires et de bien caractériser/contrôler son modèle. Celles-ci devront être utilisées dans un contexte précis souvent en supports d'autres méthodes. Ainsi, la pertinence du choix du modèle sera à déterminer en fonction de l'utilisation ultérieure.

Les limites et axes de progrès des méthodes *in vitro/ex vivo*

Par définition, les méthodes *in vitro* ne peuvent pas remplacer l'organisme entier en raison de leur isolement du contexte physiologique (humoral, tissulaire, fonctionnel, adaptatif, etc.), et dans le cas des cultures cellulaires de la difficulté à maintenir *in vitro* leurs caractéristiques même si de grands progrès ont été réalisés au cours des dernières années. Il faut aussi travailler à des doses non cytotoxiques afin d'éviter des réponses « faux positifs et / ou faux négatifs ». Toutefois, ces outils sont particulièrement utiles en mécanistique ou en screening de séries de molécules, lorsqu'un effet particulier a été identifié et que son apparition est liée à un mécanisme reproductible *in vitro*. Certaines de ces méthodes sont toutefois devenues réglementaires (ex : génotoxicité). De même elles sont utiles pour identifier les effets mélanges qui sont difficiles à étudier *in vivo*. Ces biotests sont aussi utiles pour identifier un danger dans un mélange qui n'est pas complètement caractérisé d'un point de vue chimique (mélanges complexes). Ils permettent alors d'évaluer un risque potentiel par le « poids de l'évidence ». En effet, même si aucun de ces tests pris isolément ne peut prédire les effets chez l'Homme (comme les essais cliniques ne permettent pas de prédire à 100% les effets dans l'ensemble de la population), l'accumulation de ces tests permet d'affiner la prédictivité. Ils sont très utilisés en amont pour étudier le mécanisme d'action des substances (ex : métabolisme, potentiel sensibilisant, inflammatoire, mécanismes de génotoxicité, activité hormonale etc.) et permettent d'orienter les études ultérieures selon le « endpoint ». Les progrès viennent actuellement du génie tissulaire qui permet de développer des cultures cellulaires 3D (3 Dimensions) dotées de niveaux de différenciation et d'une organisation tissulaire proche de la situation *in vivo*, se rapprochant progressivement d'organes reconstitués. Les développements actuels laissent entrevoir des possibilités enthousiasmantes en termes de « remplacement » (ex des « microships », l'utilisation de cellules souches).

► **Les méthodes dites *in silico* sont des modèles biomathématiques qui utilisent des bases de données constituées de l'accumulation de résultats expérimentaux sur modèles *in vivo* ou *in vitro***

• **Les modèles QSAR, la catégorisation chimique et le « read-across »**

Cet ensemble de méthodes se base sur le paradigme « structure-toxicité » à partir duquel il serait possible de prédire les effets adverses induits par les substances chimiques en fonction de leur structure. Théoriquement ces méthodes peuvent prédire les effets toxicologiques de façon qualitative ou quantitative. Les modèles QSAR formalisent (ex. par régression linéaire) la relation mathématique qui existe entre un ensemble spécifique de structures chimiques et leur toxicité expérimentale (jeu d'apprentissage du modèle). L'acronyme anglais QSAR signifie « Quantitative Structure-Activity Relationship » (Relations Quantitatives entre Structure et Activité).

Compte tenu de cette nature semi-empirique, les modèles QSAR ne peuvent être fiables que pour les substances qui ressemblent à celles qui forment leurs jeux d'apprentissage. Pour

faciliter l'utilisation des modèles QSAR dans un contexte réglementaire, l'OCDE a formalisé des critères de validation qui permettent de quantifier leur robustesse et leur pouvoir prédictif¹¹.

Toujours sur la base d'analogies structure-toxicité il est possible de former une catégorie de substances dont les propriétés physicochimiques et toxicologiques sont similaires ou suivent une tendance régulière en raison de leur similarité structurelle. La formalisation d'une catégorie chimique fait appel à une opinion d'expert et elle se base souvent sur des arguments de toxicologie mécanistique. Ces critères servent à identifier les propriétés physicochimiques et biologiques qui jouent un rôle clé dans les mécanismes toxicologiques. Les informations toxicologiques manquantes à l'intérieur d'une catégorie chimique peuvent être comblées grâce à des prédictions QSAR ou à des analogies structure-toxicité établies « ad hoc » par un expert.

Cette dernière approche prédictive est dénommée prédiction par « read-across » (lectures croisées en français) et elle permet de dériver la toxicité pour une molécule d'intérêt en fonction de la toxicité expérimentale qui caractérise des molécules similaires à toxicité connue (ex. calcul de la moyenne des doses létales).

Plusieurs efforts internationaux sont en cours afin de normaliser et faciliter l'utilisation de ces approches (ex. boîte à outils QSAR de l'OCDE, OpenTox, VEGA, initiatives du CEFIC) grâce à l'intégration de données expérimentales, outils informatiques et avis d'experts.

L'application d'outils QSAR en toxicologie ne se limite pas au rôle de méthode substitutive pour remplacer les tests *in vivo*, mais elle peut aussi se révéler déterminante lors de la priorisation d'une liste de substance à tester expérimentalement.

¹¹ OECD Quantitative Structure-Activity Relationships Project [(Q)SARs]
<http://www.oecd.org/env/ehs/risk-assessment/validationofqsarmodels.htm>

Les limites et axes de progrès des méthodes basées sur les analogies « structure-toxicité »

Le niveau de précision qui caractérise toutes ces méthodes ne peut pas dépasser celui qui caractérise les données expérimentales sur lesquelles elles se basent. La disponibilité de données en quantité et qualité suffisante représente donc une contrainte à laquelle toutes ces méthodes sont assujetties. En ce qui concerne leur utilisation réglementaire, une définition de la similarité chimique qui prend en compte des critères de toxicologie mécanistique (ex. électrophilicité pour la génotoxicité) augmente considérablement la pertinence des prédictions. Dans cette perspective, un axe de progrès réside dans l'intégration d'information mécanistique lors de la dérivation de modèles ou hypothèses structure-toxicité.

En ce qui concerne les prédictions par « read-across » en particulier, il faut souligner qu'elles ne sont pas encore formellement encadrées par des principes de validation et un retour d'expérience sur leur pertinence et acceptabilité par les décideurs institutionnels n'est pas encore disponible. Ce manque de connaissance rend difficile toute sorte de généralisation sur leur adéquation avec les exigences réglementaires.

D'un point de vue général, toutes les méthodes basées sur des analogies structure-toxicité peuvent être utilisées pour améliorer le poids de l'évidence, en support d'autres méthodes de prédiction des effets. En génotoxicité par exemple, ces modèles sont classiquement utilisés en complément des tests *in vitro* et/ou *vivo* comme alerte d'un risque carcinogène. Par conséquent, l'intégration d'outils QSAR au sein d'une approche basée sur les chemins de l'effet adverse (AOP) représente un axe de progrès majeur surtout dans le cadre d'une synergie avec les données issues de méthodes *in vitro*.

Cette synergie, offre aussi la possibilité de pouvoir développer des modèles QSAR en fonction d'une description physicochimique et d'une description biologique (résultats d'essais *in vitro*) des substances chimiques. Compte tenu de la disponibilité croissante de données issues du criblage *in vitro* à haut débit, les possibilités offertes par cette description conjointe pourront être prochainement étudiées et approfondies.

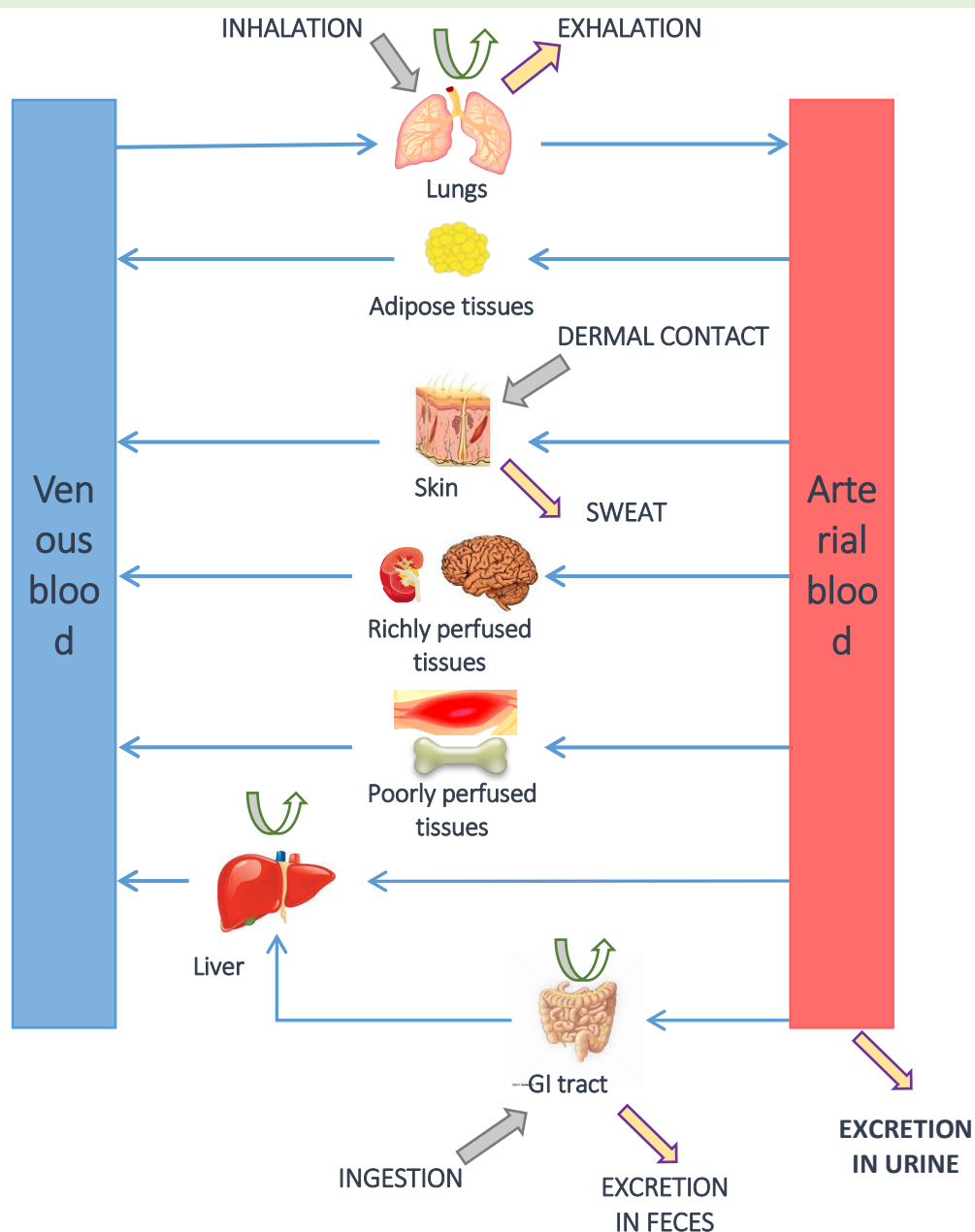
- **Les modèles PBPK (*Physiologically Based Pharmacokinetic*)**

Les modèles PBPK sont des modèles toxicocinétiques à fondements physiologiques ayant pour but de décrire le devenir des substances, et éventuellement de leurs métabolites, dans l'organisme. Ils décrivent, par des équations différentielles, l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination des composés. Ils intègrent des paramètres physiologiques (flux sanguins, volumes d'organes) et des paramètres biochimiques (coefficients de partage entre le sang et les organes, paramètres du métabolisme). Les valeurs de certains de ces paramètres biochimiques peuvent être estimées par des modèles QSAR ou des expérimentations sur cellules.

Ces modèles sont particulièrement adaptés pour des extrapolations, en particulier de résultats de toxicité obtenus soit *in vitro* (Cf. paragraphe suivant), soit pour une autre voie d'exposition que celle considérée (ce qui permet par exemple de proposer un seuil d'effet systémique par inhalation et/ou par voie dermale à partir d'un seuil d'effet déterminé pour l'ingestion).

Les limites et axes de progrès des modèles PBPK

Un des défis majeurs actuels pour la modélisation PBPK reste la difficulté de paramétrer à partir d'expérimentations *in vitro* ou de modèles *in silico* certains des processus mis en jeu. En particulier des outils performants nécessitent d'être mis en place pour les phases d'absorption et d'excrétion. Plus généralement, un axe de progrès prometteur est le développement de modèles *in vitro* dynamiques (tels que les humains-sur-puce) et leur couplage avec des modèles PBPK. Ceux-ci pourraient contribuer à l'amélioration des prédictions du devenir des substances dans les organismes vivants.



Exemple de schéma de modèle PBPK représentant les compartiments physiologiques d'un corps humain et les échanges entre ces compartiments.

- **Le couplage *in vitro* - PBPK**

Il a pour objectif de fournir une prédiction *in vivo* d'effets sur un organe ou un système donné à partir d'un modèle PBPK et de données d'effets, mesurés *in vitro* et pertinentes pour l'organe ou le système considéré. Le PBPK permet de relier une dose et un scénario d'exposition avec une concentration au cours du temps au niveau du système/organe cible. Cette concentration est ensuite rapportée à la relation dose-réponse pour l'organe ou le système considéré établie *in vitro*. L'information *in vitro* peut être obtenue à partir de matériel humain, ce qui augmente la prédictivité du couplage pour l'Homme, par rapport à l'utilisation de lignées cellulaires ou de cellules issues d'animaux. La pertinence de ce couplage n'a encore été évaluée que pour peu de molécules et peu de types d'effets. En général, la prédiction s'éloigne de la valeur réelle de moins d'un facteur 10.

- **La méthode de « synthèse d'éléments de preuve »**

Des réglementations permettent d'éviter des essais quand la somme des informations est globalement suffisante. Dans son article intitulé « les essais n'apparaissant pas comme nécessaires du point de vue scientifique » (point 1 de l'annexe XI) REACH stipule que « L'hypothèse/la conclusion qu'une substance possède ou non une propriété dangereuse particulière peut être confirmée valablement par des éléments de preuve provenant de plusieurs sources d'informations indépendantes, alors que les informations provenant de chacune de ces sources, considérées isolément, sont jugées insuffisantes pour permettre de formuler cette hypothèse/conclusion ».

Ce mode de démonstration ne repose pas sur une méthodologie scientifique fixée mais sur une méthodologie intégrant les éléments de différentes sources (ex : QSAR, expérimentations *in vitro* et *in vivo*, observations cliniques ou épidémiologiques, PBPK). C'est au cas par cas que jugent les experts. Les méthodes en cours de développement sont liées à celles des « integrated testing strategies ou ITS », puisqu'elles permettent d'associer un niveau statistique d'erreur à un état donné des connaissances. A terme cette approche relève du développement de la « vision intégrative » évoquée ci-après.

- **La chimie analytique**

Depuis une vingtaine d'années, des efforts considérables ont été fournis pour remplacer les essais sur les animaux par des méthodes physico-chimiques dans le domaine des biotechnologies à usage thérapeutique dans le but de déterminer le titre (ou la quantité de principe actif) d'une préparation. C'est par exemple le cas de nombreuses hormones qui sont produites désormais par synthèse chimique ou par technique de biologie moléculaire (protéines recombinantes synthétisées à partir d'ADN complémentaire). Ces techniques permettent de produire à grande échelle des protéines de synthèse ou recombinantes de plus grande qualité avec un niveau de sécurité bien supérieur qu'auparavant. Ainsi les techniques de Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) couplées à un système de détection ou l'électrophorèse capillaire se substituent aux bio-essais sur animaux pour déterminer le titre d'un médicament biologique recombinant. Ces méthodes ont fait l'objet d'études collaboratives préalables à leur utilisation visant à établir une équivalence entre les Unités Internationales (U.I.) déterminées selon le bio-essai et le dosage analytique.

Exemple : les monographies de la Pharmacopée européenne relatives aux produits biologiques suivants : la somatotropine (1988), l'insuline (1990), la desmopressine (1990), la calcitonine (2000), l'oxytocine (2000), la tétracostactide (2007).

D'autres méthodes physico-chimiques comme l'électrophorèse capillaire, couplées à des essais sur cellules offrent également une perspective intéressante de remplacement des essais sur animaux pour les glycoprotéines recombinantes comme l'érythropoïétine (working group « glycan mapping » EMA/DEQM).

► **Les modèles prospectifs de substitution**

• **Les cellules souches**

Les développements récents sur les cellules souches humaines ouvrent un grand nombre de voies nouvelles dans l'expérimentation *in vitro* et notamment sur des cellules d'origine humaine. Il existe plusieurs types de cellules souches : cellules souches embryonnaires pluripotentes (Embryonic Stem ou ES, dont le prélèvement, la conservation et l'utilisation sont autorisés dans notre pays depuis Septembre 2004), les progéniteurs adultes et les cellules souches issues de la reprogrammation de cellules somatiques adultes (iPS, induced Pluripotent Stem).

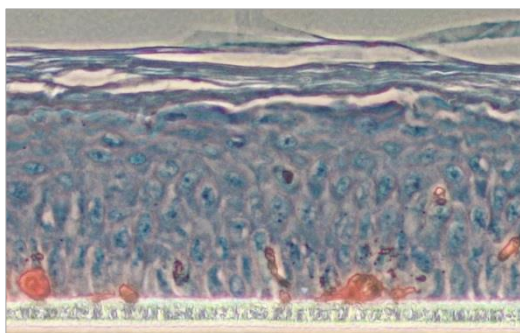
Ces cellules ont la capacité de se multiplier de nombreuses fois à condition de les soumettre à des traitements expérimentaux appropriés (facteurs de croissance, cytokines, matrice extracellulaire, etc.) mimant l'ontogenèse du tissu concerné (tissu cardiaque, tissu nerveux, tissu hépatique, etc.). On sait diriger à l'heure actuelle ces divers types de cellules souches *in vitro* vers une spécification tissulaire particulière et produire ainsi un grand nombre de cellules différentes ayant des propriétés évocatrices des cardiomyocytes, des cellules neurales, des cellules hépatocytaires, etc. Bien que le niveau de différenciation de ces cellules soit encore généralement de type fœtal (et non adulte) et qu'il existe de nombreux biais à leur utilisation, il est fort à penser que la maturation de ces cellules et leur différenciation finale pourront être maîtrisées d'ici quelques années. On pourra ainsi disposer de réserves théoriquement inépuisables de cellules de divers tissus et pourquoi pas dans un avenir plus lointain de cellules de tous les tissus qui constituent l'organisme. Cependant l'utilisation de ces cellules souches provenant de fœtus pose d'autres questions éthiques et un courant d'opinion fort se fait entendre dans plusieurs pays de l'Union européenne pour s'opposer à leur utilisation en tant que modèles de substitution à l'expérimentation animale. Il n'en est pas de même des cellules iPS différenciées à partir d'un tissu adulte, ces cellules différenciées constitueront des modèles cellulaires phénotypiquement stables permettant une individualisation des études ouvrant de nouvelles voies pour la médecine personnalisée. La variabilité interindividuelle, qui demeure un problème, pourra être abordée par des études portant sur des cellules issues de cellules ES ou iPS provenant d'embryons ou d'individus différents renforçant ainsi la représentativité des études. Un autre avantage de ces cellules est qu'il est possible de réduire (ou supprimer) l'expression de gènes spécifiques, ou au contraire de sur-exprimer des gènes spécifiques en utilisant la méthode des CrispR/cas9 ou des TALEN, créant ainsi un équivalent "humain" des animaux transgéniques dans lesquels un (ou plusieurs) gène est invalidé (knock-out) ou surexprimé. Ces possibilités ouvrent d'autres opportunités d'études expérimentales sur des cellules présentant des altérations génétiques conduisant à des maladies spécifiquement humaines. Ce type d'étude permettra d'envisager des approches expérimentales visant à améliorer le diagnostic de la maladie et surtout d'appliquer une thérapie adaptée au patient et à sa pathologie.

- **Les cultures organotypiques**

Les cultures organotypiques sont destinées à l'étude de la différenciation, de la multiplication et de la croissance de cellules ou d'organes explantés hors de leur milieu naturel et mis en culture. Les modèles les plus classiques sont les fragments de tissus, les fragments d'organes ou ébauches d'organes. Les progrès dans le domaine des biotechnologies ont permis l'émergence de nouveaux modèles permettant de reconstituer un assemblage cellulaire plus proche d'un tissu ou d'un organe qu'une culture cellulaire classique monotypique (un seul type cellulaire) de conserver les interactions et la signalisation des cellules entre elles.

Plusieurs modèles tridimensionnels existent visant à s'approcher de la structure des tissus *in vivo*. Ex, cornée, épithélium gingival). Tous sont des outils de choix pour les études de toxicité, métabolisme, absorption.

Les modèles les plus achevés sont les modèles de peau ou épidermes reconstruits, très utilisés par le secteur cosmétique. Ils apportent de nombreuses informations sur la sensibilité directe du tissu lui-même mais ne permettent pas de prédire les réactions du reste de l'organisme.



Modèle d'épiderme reconstruit

EpiCS-M-Cellsystems®: épidermes humains reconstruits contenant des mélanocytes permettant d'étudier des effets sur la pigmentation de la peau.



Modèle de cornée reconstruite

HCE Skinethic®: Ce modèle issu de la lignée HCE, cellules épithéliales de cornée humaine est très utilisé pour évaluer le potentiel irritant d'une substance chimique

- **Les organes bio-artificiels**

En réponse à la simplicité du système statique en boîte de Pétri, qui ne permet pas de reproduire certains phénomènes *in vivo*, une nouvelle catégorie de tests *in vitro* est apparue, les systèmes en environnement dynamique. Plusieurs dénominations existent, mais la plus courante est le terme « organes bio-artificiels ».

Ces systèmes proposent la mise en culture des cellules au sein d'un système de perfusion (environnement dynamique créé par un fluide circulant). Ils permettent une réorganisation cellulaire proche des conditions d'exposition de l'organe *in vivo* (par exemple, une culture à 3 dimensions) et un couplage *in vitro* entre différents organes. Ils possèdent des niveaux d'activité cellulaire supérieurs à ceux mesurés en boîte de culture.

Dans le domaine de l'évaluation du risque toxicologique, la mise au point de ces systèmes et du traitement mathématique des données générées est en cours de développement.

Les limites et axes de progrès communs à tous les tests alternatifs de remplacement

Malgré leur potentiel et leurs premières applications, les méthodes *in vitro* ne peuvent pas complètement remplacer l'expérimentation animale en l'absence d'analyse de paramètres biologiques ou à cause de leur isolement du contexte physiologique (humoral et cellulaire), de leur dédifférenciation rapide (perte de la compétence métabolique) dans certaines conditions et de leur durée de survie souvent limitée à quelques jours mais qui, avec les techniques de culture modernes, peut aller jusqu'à quelques semaines sans dédifférenciation.

Par ailleurs, la validation d'une méthode alternative utilisée dans un cadre réglementaire, nécessite de nombreux critères expliquant la difficulté de la mise au point de nouvelles techniques. En effet, une méthode alternative doit être pertinente, c'est-à-dire que le critère observé doit être spécifique de l'effet toxique ou pharmacologique à mettre en évidence. Elle doit être assez robuste pour que toutes les molécules présentant de tels effets soient détectées.

Ceci a pour conséquence directe que ces méthodes sont généralement considérées comme trop sensibles car le nombre de faux positifs est non négligeable. Ces méthodes doivent montrer une très bonne reproductibilité intra- et inter-laboratoire ; le modèle choisi doit donc être peu variable ou avec une variabilité n'influençant que faiblement le résultat. Ceci a de nombreuses conséquences en particulier en termes de normalisation des milieux d'origine.

LA RÉDUCTION

- **L'outil statistique**

Le développement et l'application de méthodes statistiques pertinentes (statistiques non paramétriques) donne des outils puissants pour réduire la taille des lots expérimentaux tout en retirant un nombre important d'informations à partir d'une seule procédure. A ce titre la construction de la procédure et le choix pertinent des contrôles sont des éléments déterminants. A ceci s'ajoutent la création et l'exploitation de bases de données permettant d'éviter la répétition inutile de certaines études. Ces démarches sont fortement encouragées dans la Directive 2010/63 et dans la réglementation française qui en a découlé.

- **L'utilisation d'espèces « moins sensibles »**

Cette démarche se fonde sur l'idée qu'il existe une hiérarchie des sensibilités à la contrainte entre espèces. Au-delà de la vision émotionnelle du public qui accorde plus de sensibilité au chien, animal de compagnie, qu'au porc, animal de rente, il n'en demeure pas moins vrai qu'il existe un parallélisme relatif entre échelle phylogénétique et sensibilité à la contrainte, malgré certaines exceptions possibles (cas des céphalopodes). La mise en place du réseau EFOR dans le cadre des plateformes IBISA est une initiative importante dans ce domaine.

Les limites et axes de progrès

Le réseau EFOR visant à informer sur l'existence, les potentialités de nouvelles espèces modèles et de faciliter l'accès aux centres disposant des connaissances sur ces espèces, constitue une intéressante initiative de la communauté scientifique à la limite entre le remplacement et la réduction pour faire émerger de nouveaux modèles en accord avec la règle des 3R. La directive 2010/63 fait obligation dans son article 13 de choisir l'espèce la moins susceptible de ressentir de la douleur de la souffrance de l'angoisse et ou de subir des dommages durables.

- **Le contrôle de la variabilité de réponse**

Elle se fonde sur le contrôle et la reproductibilité des éléments environnementaux pouvant induire une variation de réponse. C'est le cas du contrôle des paramètres d'environnement mais également du statut sanitaire et génétique des animaux : des efforts considérables dans ce domaine dans la recherche industrielle et plus récemment en recherche publique ont conduit à la création et la mise en place d'établissements d'expérimentation animale de qualité garantissant la qualité génétique et sanitaire des modèles utilisés. Là aussi les réseaux tels que le réseau ROCAD de normalisation de la qualité et de facilitation de l'échange des modèles murins génétiquement modifiés, mais également le réseau CELPHEDIA de (Creation Elevage, Phénotypage, Distribution et Archivage) des espèces modèles sont moteurs dans l'implémentation des 3R en France. Enfin les référentiels de qualité (Bonnes Pratiques de Laboratoire, ISO) ou d'accréditation autres (AAALAC, ...) sont très vigilants sur tous les facteurs pouvant impacter cette homogénéité de réponse avec risque de répétition d'études. Il reste cependant au moins chez les rongeurs l'obstacle de la dérive du microbiome qui constitue aujourd'hui une des sources majeures d'hétérogénéité de la réponse entre les mêmes lignées murines de statut sanitaire équivalent mais provenant de sources différentes.

- **L'amélioration de la reproductibilité**

Depuis quelques années déjà de nombreuses voix se font entendre soulignant la faible reproductibilité et surtout la très faible représentativité de la majeure partie des études sur l'animal : l'analyse rétrospective de nombreuses études à travers le monde a montré une tendance marquée à l'installation de biais systématiques : utilisation d'un seul sexe, absence de randomisation des lots, absence de critères d'objectivation du choix des animaux entrant dans les études, absence de lecture en double aveugle, biais dans le choix et la présentation des résultats sont des sources majeures de faible reproductibilité et de non représentativité des études. De plus, et en contradiction avec le paragraphe précédent les auteurs soulignent l'indigence des résultats obtenus sur des lignées strictement homogènes et recommandent de développer pour les études pré cliniques une méthodologie comparable à celles des bonnes pratiques en études cliniques : essais multicentriques, utilisation de plusieurs lignées différentes, utilisation des deux sexes, application des méthodologies précédemment décrites. Une telle démarche existe déjà à travers par exemple le réseau Européen CAMARADES (Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies) dédié au développement de modèles expérimentaux et à la validation de la thérapie des AVC.

- **Les « Omics »**

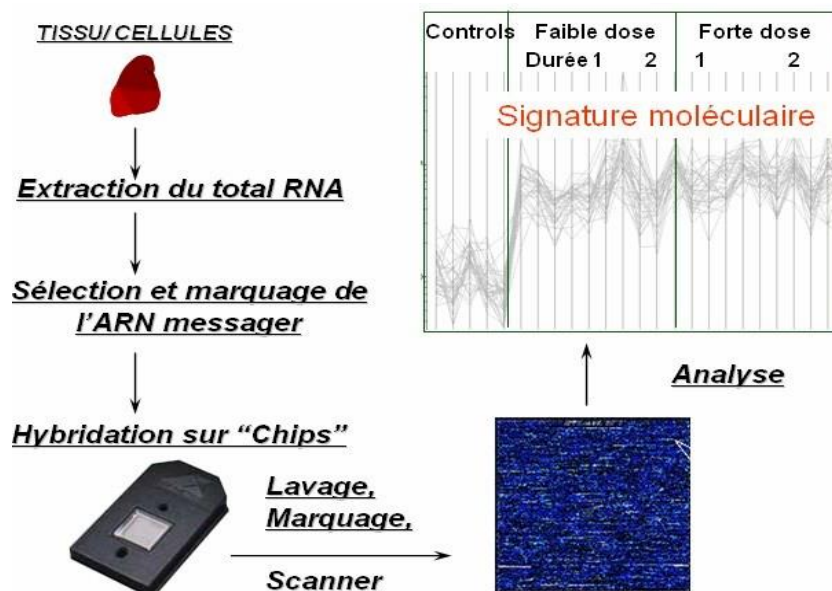
Ce sont des technologies d'analyse à haut débit visant à explorer au niveau moléculaire les différentes étapes de la voie de biosynthèse des protéines, des gènes aux protéines (génomique-gène, transcriptomique-ARNm, protéomique-protéines) mais aussi des enzymes aux métabolites (métabolomique). Lorsque ces outils sont appliqués à l'échelle cellulaire, on parle de cellulomique.

Ces technologies sont de plus en plus utilisées en recherche biomédicale en amont de l'expérimentation animale voire en aval à des fins mécanistiques, sachant que dans tous les cas, du matériel biologique (animal le plus souvent) est utilisé comme source d'information.

Dans une optique de réduction, l'application des technologies « Omics » aux fluides (ex. protéomique du plasma ou de l'urine) ou à des biopsies humaines (ex. transcriptomique d'une biopsie hépatique) permettront de diminuer le nombre d'animaux utilisés dans une

étude. Dans une optique d'optimisation (raffinement), ceci permettra de rendre l'étude plus informative en comparant l'expression d'un génome entier par exemple à différents temps de prélèvements ou états de l'animal (avant/après traitement ou « knock-out » d'un gène) en s'affranchissant des différences interindividuelles (si le matériel biologique initial provient de pools d'animaux).

Enfin, à l'issue des expériences, la création de bases de données publiques (ou payantes) permet une optimisation de l'utilisation de ces résultats coûteux.



Etapes d'une expérience de génomique jusqu'à l'identification d'une signature moléculaire (Ensemble de gènes dont la variation est spécifique d'une condition)

Les limites et axes de progrès des technologies « Omics »

La toxicogénomique fait l'objet d'un travail considérable. Cette discipline récente vise à relier la toxicologie et les avancées concernant la connaissance du génome. Il s'agit de mettre en relation des variations dans l'expression des gènes avec l'exposition à différentes concentrations de composés chimiques. A l'heure actuelle, les avancées ont surtout eu lieu dans le domaine des signatures génomiques, à partir des puces à ADN.

L'utilisation étendue voire systématique de ces technologies nécessite tout d'abord :
D'améliorer leur variabilité expérimentale qui reste élevée, Leur analyse statistique reste encore à améliorer,

La mise en place de bases de données permettant de mutualiser les résultats obtenus et une analyse de ces données plus fiables (une partie de l'analyse s'effectue par « clustering » c'est-à-dire le regroupement de signatures identiques. Afin d'être informatif, le système doit contenir le plus possible de molécules de référence).

L'optimisation des bases de données en incluant un plus grand nombre de molécules à but thérapeutique, dont les effets sont souvent plus difficiles à mettre en évidence que les produits chimiques

Si l'espoir suscité par la toxicogénomique est justifié, il reste encore du chemin à parcourir avant de voir ces techniques participer à l'évaluation des risques.

- **Les modèles animaux : Modèles pathologiques génétiquement modifiés (transgéniques)**

Un animal transgénique est un animal dont le patrimoine génétique (un gène ciblé) a été modifié afin d'étudier le rôle *in vivo* de la protéine codée par le gène modifié ou bien quand le gène est connu pour être responsable d'une maladie, de reproduire les symptômes d'une maladie humaine pour pouvoir mieux étudier la maladie et *in fine* la traiter. On parle de souris « knock-out » lorsqu'un gène est invalidé ou altéré et de souris « knock-in » lorsqu'un nouveau gène est ajouté au génome. Quatre-vingt-quinze pour cent des animaux transgéniques utilisés à des fins expérimentales sont des souris « knock-out » et à ce jour 10 000 gènes ont été invalidés chez la souris. D'ailleurs Mario R. Capecchi, Martin J. Evans et Olivier Smithies ont reçu le prix Nobel de Médecine et de physiologie pour leurs travaux sur les cellules souches et la recombinaison homologe. Les animaux transgéniques permettent d'étudier de manière précise certains mécanismes des maladies humaines et de réduire le nombre d'animaux non OGM qui auraient été utilisés le cas échéant.

- **Les Approches intégrées développées sur la base des mécanismes / modes d'action¹²**

Toujours dans le domaine de la réduction, les approches intégrées peuvent constituer des voies de réduction.

Deux types de stratégies, l'une fondée sur l'utilisation de cribles biologiques (des composés sont testés au préalable et leurs effets biologiques évalués *a posteriori*) l'autre sur l'élaboration d'hypothèses (les composés sont d'abord testés dans des systèmes *in vitro* avant d'être testés sur l'animal) – peuvent permettre de réduire de manière très efficace le nombre d'animaux d'expérimentation.

Ces stratégies ont été particulièrement mises en application dans l'industrie pharmaceutique depuis de nombreuses années, ce qui a permis de diminuer significativement le nombre de molécules arrivant au stade des études *vivo* non cliniques.

Des travaux ont été engagés afin de développer des stratégies d'essai et l'OCDE a récemment publié (OECD, 2014b) un document guide sur une approche intégrée pour l'irritation et la corrosion de la peau, décrivant une stratégie d'essai selon que les informations disponibles concernant la substance visée indiquent une substance potentiellement négative (non-corrosive et non-irritante ; approche « bottom-up ») ou le contraire (approche « top-down »). Ce document décrit également de façon systématique tous les essais ou sources d'information pertinentes pour l'évaluation de ce danger. Les Lignes Directrices relatives à l'irritation/corrosion de la peau sont en cours de mise à jour afin de faire référence à ce document guide récent.

¹² Workshop Report. Integrated Testing Strategies (ITS) for Safety Assessment, Altex 32(1), 2005.

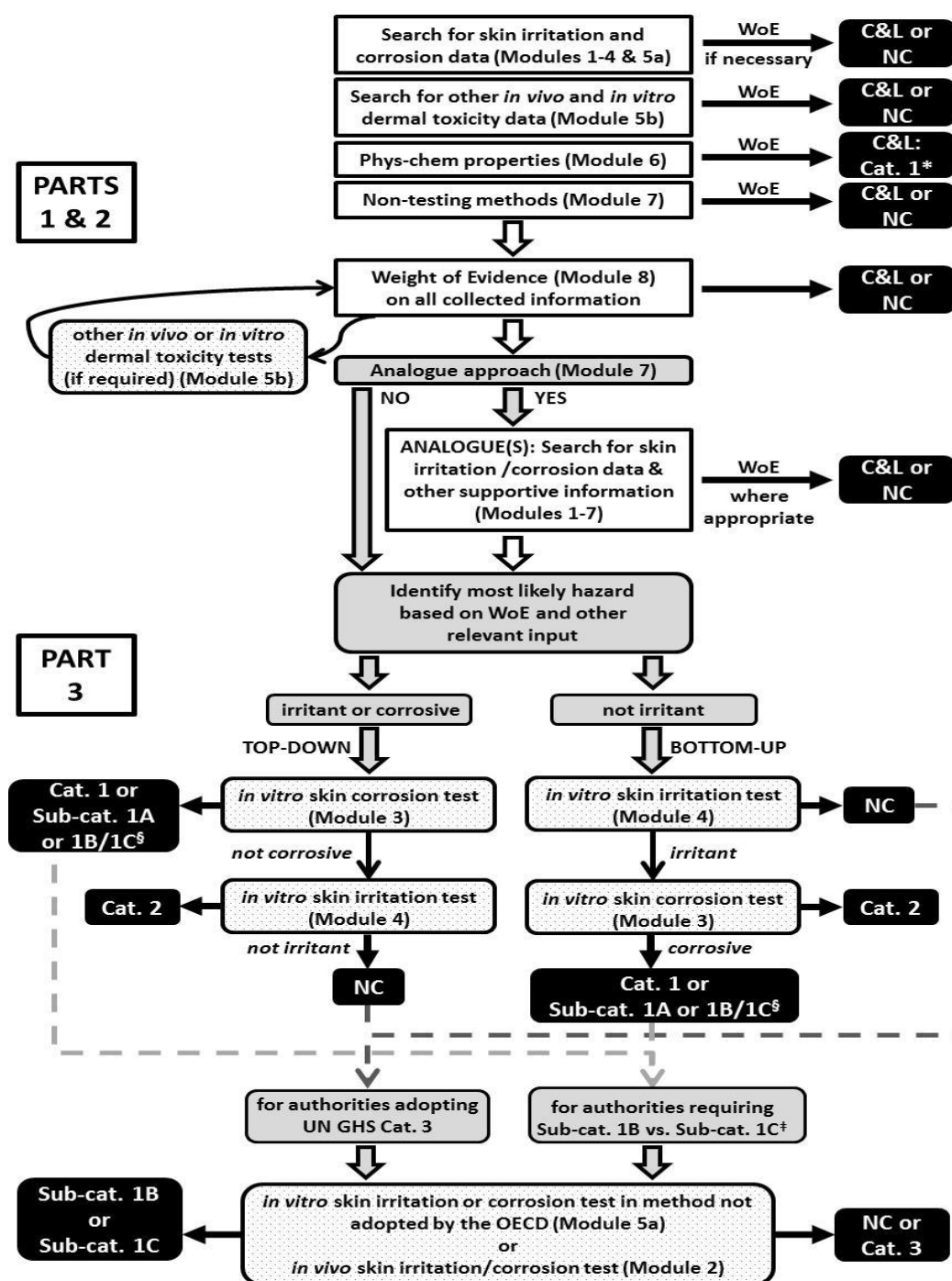


Figure stratégie d'essai irritation/corrosion de la peau (OECD, 2014b)

D'autres documents similaires pourraient à moyen terme être développés en irritation/corrosion de l'œil, en sensibilisation cutanée, en génotoxicité ou pour l'évaluation des substances cancérigènes non-génotoxiques. En écotoxicité, une approche par seuil avait été publiée par l'OCDE (OECD, 2010) pour l'évaluation de la toxicité aiguë en milieu aquatique. Un cadre d'utilisation des essais sur poisson avait également fait l'objet d'une publication (OECD, 2012) et d'une stratégie d'essai couvrant plusieurs effets potentiels (toxicité aiguë, toxicité chronique, bioaccumulation, perturbation endocrinienne).

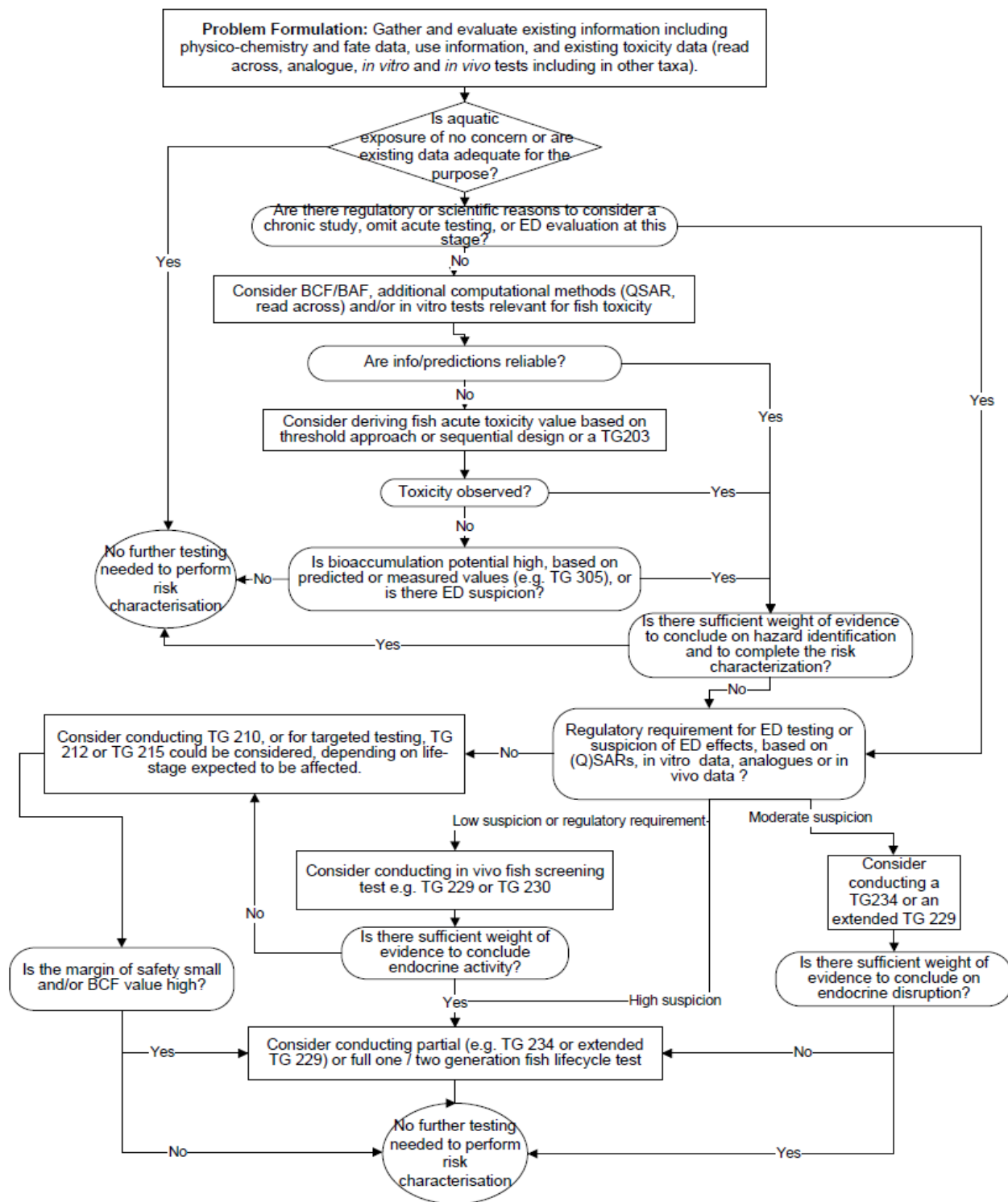


Figure stratégie d'essai pour les essais sur poissons (OECD, 2012)

Les “Adverse Outcome Pathways” (AOP)

Une meilleure connaissance de certains modes d'action entre la substance chimique et la cible biologique aboutissant à des effets néfastes pour l'organisme permet aujourd'hui d'envisager la description de voies toxicologiques impliquées dans les effets indésirables (« Adverse Outcome Pathways » ou AOP en anglais). Un premier exemple, l'AOP pour la sensibilisation de la peau (OECD, 2013), a permis de décrire les événements déterminant la cascade des réponses biologiques faisant suite à l'interaction avec la molécule chimique.

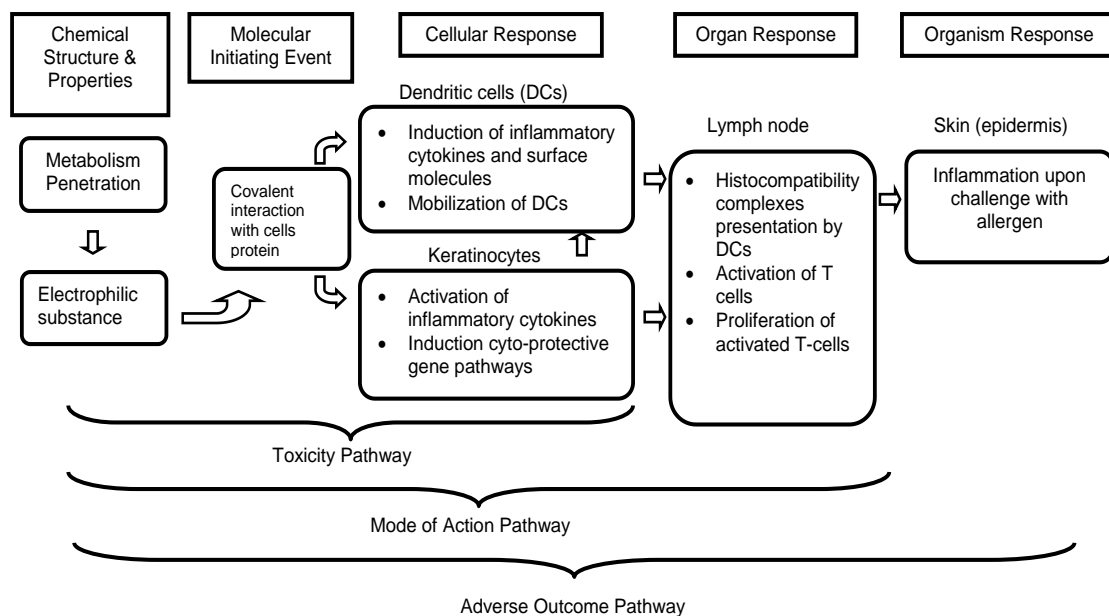


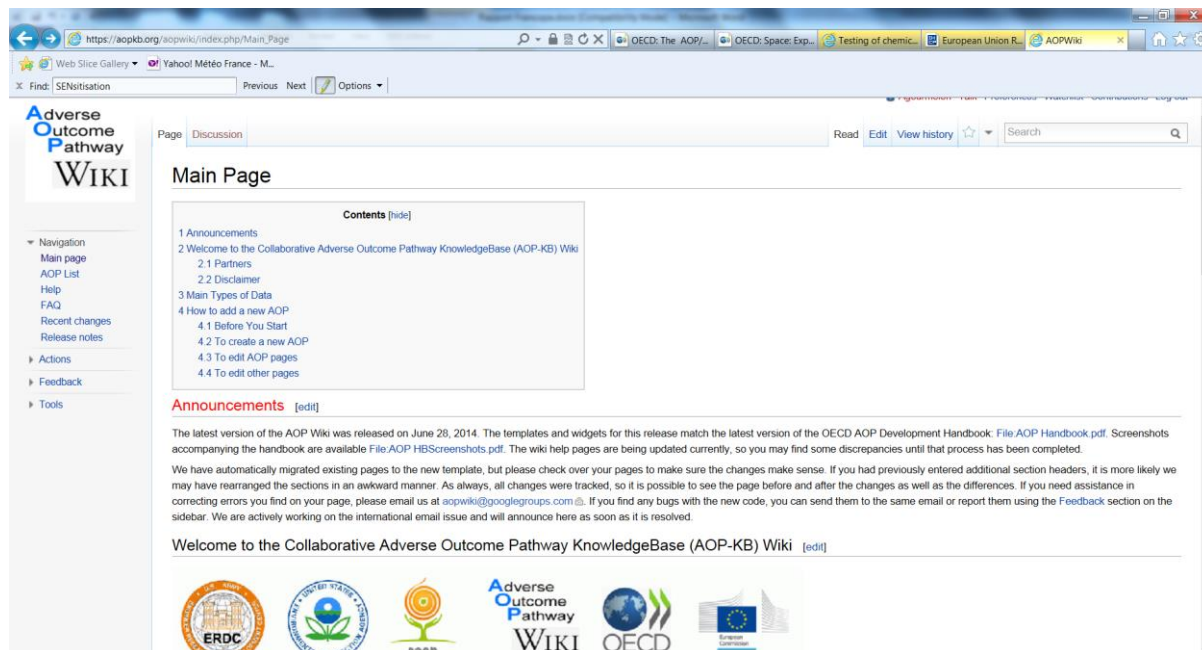
Figure AOP sensibilisation de la peau (OECD, 2013)

Cet AOP a ensuite fait l'objet de développement de méthodes d'essai reproduisant *in chemico* ou *in vitro* certains de ces événements clés. La connaissance du mode d'action ajoute de la pertinence biologique à une hypothèse testée expérimentalement et facilite l'acceptation réglementaire, du moins si l'essai est démontré comme sensible, spécifique et reproductible. Ces méthodes d'essai constitueront bientôt des nouvelles Lignes directrices de l'OCDE. Cependant, chacune de ces nouvelles Ligne directrice ne donnant pas de réponse définitive, il faudra s'accorder sur les croisements d'informations permettant de tirer des conclusions fiables. Sans cela, de nombreux double-emplois seront occasionnés et les essais *in vivo* resteront les seuls garants de fiabilité.

L'élaboration d'un cadre conceptuel d'utilisation des essais permet de trouver le consensus autour d'une stratégie selon, par exemple, que l'on a affaire à une substance présumée positive ou négative (propriété physico-chimique, alerte structurelle pertinente pour l'effet ciblé), ou selon, autre exemple, que l'on obtient un résultat positif ou négatif lors d'un test dont la sensibilité et la spécificité sont connues et démontrées, ou selon que, dernier exemple, l'objectif est de déterminer la sévérité/puissance de l'effet. Toutes ces considérations doivent faire partie de la formulation du problème et être adressées dans le cadre conceptuel. Ce dernier peut rester flexible, mais doit refléter le cheminement optimal pour parvenir à prendre une décision sans avoir recours à des essais non nécessaires.

« AOP-KNOWLEDGE BASE » comme outil de gestion des connaissances ¹³

L'OCDE a rendu public un outil Internet développé en collaboration avec l'Agence américaine pour la Protection de l'Environnement (US EPA) et le Centre Conjoint de Recherche de la Commission européenne (JRC).



Cet outil collaboratif est ouvert au public depuis septembre 2014 (www.aopwiki.org) : chercheurs, toxicologues de l'industrie, agences réglementaires, sociétés scientifiques, etc. Il sert de base commune pour décrire et documenter les AOPs, selon un système standardisé et codifié afin d'apporter à la connaissance de tous les avancées sur les voies toxicologiques impliquées dans des effets indésirables. Des commentaires et contributions externes (aspect collaboratif) sont possibles. Éventuellement, une revue critique et approbation par les pays de l'OCDE sera aussi possible afin de formaliser l'AOP à un stade avancé et permettre des applications réglementaires type développement de Lignes Directrices, profilage dans la boîte à outil QSAR (QSAR Toolbox : www.qsartoolbox.org), stratégies d'essai, approches d'évaluation par catégorie de substances chimiques.

Il est entendu que le développement de ces AOP et approches intégrées sont des activités à moyen et long-terme, et que dans un avenir proche il est peu probable que les classes de dangers complexes (ex. cancérogenèse, toxicité sur la reproduction et le développement)

¹³ OECD (2009). The Guidance Document for Using the OECD (Q)SAR Application Toolbox to Develop Chemical Categories According to the OECD Guidance on Grouping Chemicals. Series on Testing and Assessment No. 102. OECD, Paris

OECD (2010). Short Guidance on the Threshold Approach for Acute Fish Toxicity. Series on Testing and Assessment No. 126. OECD, Paris

OECD (2012). Fish Toxicity Framework Test. Series on Testing and Assessment No. 171. OECD, Paris

OECD (2013). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris

OECD (2014a). Guidance on grouping of chemicals, second edition. Series on Testing and Assessment No. 194. OECD, Paris

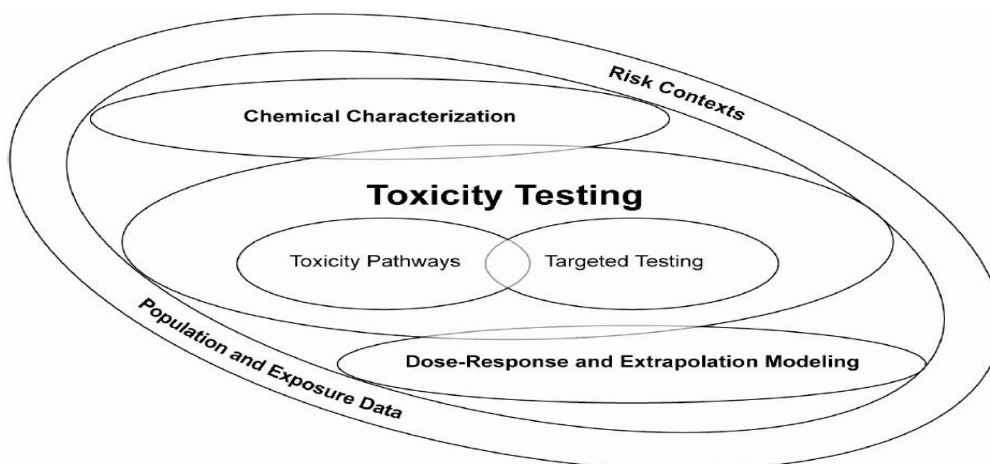
OECD (2014b). Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Series on Testing and Assessment No. 203. OECD, Paris

auront une liste exhaustive d'AOPs décrivant toutes les voies toxicologique possibles. Cependant une rationalisation des ressources utilisées pour les essais et l'évaluation des dangers reste possible, ainsi que le développement de méthodes alternatives venant s'inscrire dans la cascade d'événements clés menant à un effet néfaste, sans pour autant que l'on connaisse tout de l'AOP. De même une connaissance partielle d'un AOP peut permettre de grandes avancées en termes d'évaluation des dangers par exemple par le regroupement de substances qui déclenchent le même AOP.

► Une vision intégrée / intégrative

Le Comité sur l'Evaluation de la Toxicité des Polluants Environnementaux du « National Research Council » américain, a réalisé, à la demande de l'Agence américaine de Protection de l'Environnement (US EPA), un rapport sur sa vision du futur de la toxicologie (cf. figure ci-dessous). Il propose une approche intégrative dans laquelle les perturbations biologiquement significatives de mécanismes clefs d'une toxicité seront évaluées à l'aide du couplage de nouvelles méthodes de modélisation mathématique et un large ensemble de tests *in vitro* basés sur la biologie humaine (et non animale).

La Figure ci-dessous illustre les principales composantes de la vision du Comité américain : Caractérisation des propriétés chimiques, tests de toxicité, et modélisation des relations dose-réponse et des extrapolations requises. Ces composantes sont liées mais elles impliquent des capacités scientifiques et techniques spécifiques. Certaines évaluations pourront procéder séquentiellement dans l'ordre indiqué ci-dessus — mais une telle séquence ne sera pas forcément nécessaire. Un élément crucial de cette nouvelle vision est la prise en considération du contexte du risque (contexte de prise de décision impliquant la collecte d'informations sur la toxicité) à chaque étape et la possibilité de sortir à tout moment du circuit si une quantité suffisante d'informations a été collectée pour pouvoir prendre une décision. Cette vision met aussi l'accent sur les connaissances mécanistiques de la toxicité et sur l'identification nécessaire des grandes voies de toxicité. L'approche met aussi l'accent sur la production et l'utilisation de données sur les expositions humaines et leurs effets dans la population quand cela est possible, afin de mieux interpréter les résultats des tests. Elle encourage la collecte de telles données par le bio-monitorage, la surveillance, et des études épidémiologiques pour les produits chimiques les plus importants. Finalement, cette vision anticipe le besoin d'une procédure formelle pour l'adoption ou l'abandon de méthodes de tests, au fur et à mesure des avancées scientifiques, ceci afin de garantir une évaluation en temps voulu, efficace et économique de tous les produits chimiques.



Extrait de : "Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy" (2007)
National Research Council of the National Academies

<https://www.nap.edu/catalog/11970/toxicity-testing-in-the-21st-century-a-vision-and-a>

L'OPTIMISATION ou LE RAFFINEMENT

► *La diminution de la douleur / de la contrainte / du stress*

Les stratégies d'optimisation comportent au premier chef toute les démarches visant à contrôler, réduire voire supprimer la douleur, la contrainte du stress chez l'animal. Il est important de souligner la difficulté qu'il y a à identifier les composantes émotionnelles associées à la nociception qui fondent la douleur et surtout la souffrance chez l'animal. Cela a d'ailleurs fait l'objet d'une commande des ministres chargés de la recherche et de l'agriculture à l'INRA pour ce qui concerne les animaux de rente. Il n'en demeure pas moins que l'existence d'une nociception conduisant à une cascade de réponses physiologiques et comportementales chez l'animal oblige à mettre en œuvre des moyens de contrôle de la douleur réelle ou présumée, et ce d'autant que ces réponses sont susceptibles d'altérer la validité des études. La mise en œuvre systématique de telles méthodes pour réduire la douleur potentielle chez l'animal est aujourd'hui réglementée et systématique dans les établissements d'expérimentation animale en France et contrôlée par l'inspection vétérinaire. Néanmoins dans certains cas (modèles de pathologies inflammatoires, études sur la douleur), la mise en œuvre de telles méthodes peut être contradictoire avec le projet expérimental.

L'acclimatation et le conditionnement constituent des voies majeures de la diminution de la contrainte et du nombre d'animaux. L'acclimatation rendue obligatoire par la directive est de plus en plus systématiquement complétée par une habituation aux procédures ou au conditionnement opérationnel des animaux. Par exemple l'animal peut être habitué aux conditions de l'expérimentation pendant quelques jours avant la mise en œuvre de la procédure. La diminution de stress obtenue permet alors une meilleure reproductibilité et une représentativité accrue du modèle ce qui peut contribuer à la réduction comme au raffinement. Il peut également être conditionné pour réaliser seul certaines actions évitant ainsi une contention source de stress au moment de la réalisation du geste. On peut citer par exemple 1) l'utilisation de module de transfert permettant de réaliser des pesées sans contention (les animaux vont aller spontanément de leur module de stabulation à un module de transfert servant à la pesée), 2) le conditionnement positif à la présentation spontanée d'un membre permettant de réaliser des injections ou des prélèvements de sang. Ces apprentissages sont obtenus par la récompense (friandises, caresses, etc.).

Un autre moyen de diminuer la contrainte est par exemple l'amélioration des méthodes d'analyses. La réalisation de prélèvements de sang pour l'évaluation de la cinétique de produits à étudier est un requis indispensable dans de nombreux domaines. Les nouvelles technologies permettent, pour certains produits, de faire ces dosages sur des quantités très faibles de sang. Les prélèvements de sang à effectuer sont alors beaucoup plus faibles, ce qui permet de diminuer significativement la contrainte pour les animaux. Chez les rongeurs, il est maintenant possible de ne collecter qu'une goutte de sang (sur le même principe que pour une mesure de glycémie chez les diabétiques) au niveau d'une veine latérale d'une patte postérieure. Le développement de la méthode de « microsampling » a également permis d'envisager dans le futur de supprimer les animaux satellites jusqu'alors nécessaires à ces cinétiques et a d'ores et déjà permis de diminuer par 2 à 3 le nombre de souris nécessaires.

L'amélioration des conditions d'hébergement des animaux, la qualité et la formation du personnel en charge des soins de l'hébergement et de l'application des procédures d'expérimentation, la prise en compte au quotidien du bien-être animal, la définition de points limites adaptés aux objectifs des expérimentations, l'évolution des objectifs des expérimentations (en particulier pour les études réglementaires ; par exemple la suppression de la mortalité comme point limite dans les études de toxicité aiguë sous l'impulsion de l'industrie pharmaceutique) ont pour effet la diminution des contraintes pour l'animal.

► **Les nouvelles approches en expérimentation animale**

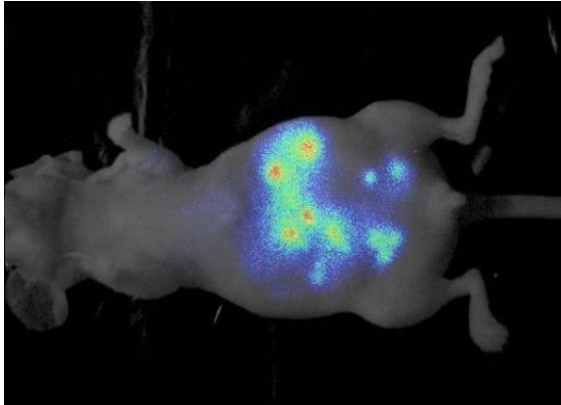
Les nouvelles approches en expérimentation animale permettent à la fois de réduire la souffrance des animaux et le nombre d'animaux utilisés en combinant différentes méthodes d'exploration non invasives développées en médecine humaine et qui peuvent être appliquées à l'exploration chez l'animal. Certaines de ces méthodes non invasives utilisées depuis longtemps peuvent être intégrées dans la démarche d'optimisation : c'est le cas des méthodes d'examen clinique de l'espèce et de la pathologie étudiée, de l'analyse comportementale et de l'électrophysiologie. D'autres méthodes plus récentes contribuent fortement à l'optimisation des procédures.

• **L'imagerie du petit animal *in vivo***

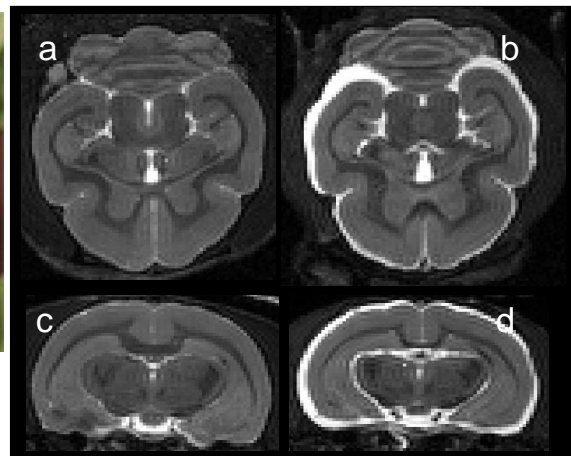
Ces méthodes ont ouvert de nouveaux champs d'investigation *in vivo* contribuant à l'optimisation. Les techniques d'imagerie citées ci-dessous permettent de visualiser la structure d'un organe, son fonctionnement, la présence de molécules spécifiques (récepteurs membranaires par exemple) ou certaines voies biochimiques sans avoir recours à des techniques invasives (une simple anesthésie de l'animal pour l'empêcher de bouger suffit). Elles contribuent également à la réduction en permettant la réalisation d'études longitudinales sur le même animal

Les approches exploratoires couvrent principalement :

- L'imagerie par résonance magnétique (IRM),
- La tomographie par émission de positrons (TEP) basée sur l'utilisation de divers marqueurs isotopes lourds tels que ^{18}F , ^{13}N , ^{15}O ,
- La scintigraphie ou SPECT, basée sur l'utilisation de radio-nucléotides utilisés comme traceurs,
- L'imagerie anatomique par rayons X pour visualiser les structures osseuses et parfois certains tissus mous,
- Les ultrasons pour visualiser l'anatomie des tissus mous,
- La bioluminescence basée sur l'activité d'une enzyme, la luciférine, utilisée sur les modèles de souris transgéniques.



L'imagerie en bioluminescence est basée sur la détection de la lumière émise lors de la catalyse par l'enzyme luciférase de son substrat luciférine. Cette technique offre un procédé de choix pour l'évaluation de nouvelles molécules à visée thérapeutique anticancéreuse. Elle est très complémentaire d'une autre méthode optique, la Fluorescence, qui permet de suivre en temps réel la distribution de molécules thérapeutiques. Bioluminescence et Fluorescence fonctionnent sur le même instrument. *Plateforme Imagerie optique du petit animal, IAB, INSERM/UJF U823.*



Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM)

Sections horizontales (a, b) et coronales (c, d) acquises en IRM de cerveaux du primate microcèbe murin (photo). La méthode d'IRM permet de mettre en évidence, *in vivo*, une atrophie cérébrale importante (b, d), entraînant une augmentation de liquide céphalorachidien autour du cerveau (flèches), chez des animaux souffrants de pathologies cérébrales liées au vieillissement.

Marc DHENAIN – CRC.

- **La télémétrie**

Elle est utilisée pour enregistrer en continu des paramètres physiologiques dont les paramètres cardiovasculaires, la température corporelle. Cette technique non invasive s'avère particulièrement efficace notamment dans les études chroniques et sub-chroniques. Cette technique a permis non seulement de diminuer les contraintes pour l'animal mais a aussi amélioré la qualité des données expérimentales. Son application reste cependant limitée à un nombre réduit d'animaux compte-tenu des contraintes techniques (qualité du signal, taille des animaux pour les rongeurs, traitement des données). De plus elle est souvent incompatible avec certaines méthodes d'imagerie *in vivo* telles que l'IRM. Cependant la miniaturisation des capteurs et l'optimisation des systèmes de transfert ouvrent des voies nouvelles de diminution de la contrainte subie par les animaux

II- LA PLACE DES MÉTHODES ALTERNATIVES DANS LES CADRES LÉGISLATIFS ET RÉGLEMENTAIRES

Les directives et règlements décrits ci-dessous prennent en compte le besoin de réduire l'utilisation de l'animal en prônant l'utilisation de méthodes alternatives *in vitro*, *in silico*. Cependant, le manque de méthodes alternatives validées au sens réglementaire du terme n'est pas sans conséquence sur le fonctionnement des réglementations destinées à assurer la sécurité de l'Homme, de l'animal et la protection de l'environnement.

1. LA DIRECTIVE 2010/63/UE ¹⁴

La réglementation qui encadre aujourd'hui la validation des méthodes alternatives est organisée autour de la directive européenne 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Entrée en vigueur en février 2013 (décret n° 2013 – 118, 1er Février 2013), elle prend en compte les dernières avancées scientifiques et les nouvelles connaissances en matière de bien-être animal.

C'est cette directive qui organise aujourd'hui le développement, la promotion et la validation des méthodes alternatives pour les règlements européens relatifs aux produits chimiques, aux biocides, aux produits phytosanitaires, mais aussi aux réglementations traitant de produits non mis sur le marché comme les polluants. « Elle a pour finalité le remplacement total des procédures appliquées à des animaux vivants à des fins scientifiques et éducatives dès que cela sera possible sur un plan scientifique » (considérant 10). Plusieurs réglementations européennes appellent au développement de méthodes alternatives, de manière incitative ou contraignante, notamment celles relatives aux cosmétiques (Règlement (CE) N°1223/2009), aux produits pharmaceutiques et aux produits chimiques (Règlement REACH (CE) N°1907/2006 et CLP3 (UE) N° 1272/2008).

Pour en savoir plus, cf. annexe 1 « la réglementation nationale » et annexe 1 « la réglementation européenne »

2. CAS DES PRODUITS CHIMIQUES

► La réglementation européenne REACH 1907/2006

Le règlement REACH, vise à améliorer la protection de la santé humaine (travailleurs et consommateurs) et de l'environnement en imposant aux industriels de démontrer la maîtrise des risques liés aux usages de leurs substances. Ce règlement soumet à enregistrement auprès de l'ECHA, l'Agence Européenne des Produits Chimiques, les substances fabriquées ou importées en Europe à une tonne ou plus par an.

REACH définit les informations nécessaires qui dépendent principalement du volume de production ou d'importation de la substance. Les tests sur animaux ne doivent être entrepris qu'en dernier recours lorsqu'il n'existe pas d'autre manière scientifique fiable d'examiner l'impact des produits chimiques sur les êtres humains ou l'environnement

Le règlement contient un certain nombre de dispositions relatives au partage des données afin d'éviter la répétition d'essais inutiles. Ainsi REACH impose aux fabricants et importateurs de partager les données toxicologiques et éco-toxicologiques concernant les essais sur animaux vertébrés.

Egalement, le règlement autorise les déclarants à ne pas effectuer les essais prévus, en proposant, sous certaines conditions, l'utilisation de données non issues d'essais standards

¹⁴ Réglementation nationale : <http://www.recherche-animale.org>

ou issues de modèles QSAR, de méthodes *in vitro*, de « *read-across* » ou d'éléments de preuves. Ces utilisations doivent être assorties d'une description et justification suffisantes et pertinentes permettant de juger leur recevabilité.

Enfin, en cas de données manquantes, la réalisation de certains essais doit être préalablement proposée à l'ECHA qui statue sur la pertinence des tests proposés après s'être assurée via une consultation publique de l'absence de données ou informations fiables. Environ 700 propositions de tests sur vertébrés ont été déposées à l'ECHA pour chaque phase d'enregistrement en 2010 et 2013 (substances fabriquées/importées à plus de 1000 tonnes/an et entre 100-1000 tonnes/an, respectivement).

En juillet 2011 et en juin 2014, l'ECHA a publié un rapport sur l'utilisation des tests alternatifs à l'expérimentation animale pour la réglementation REACH¹⁵. Ces rapports montrent que le partage de données entre déclarants d'une même substance est efficace puisque seulement 0,3% des dossiers soumis conjointement ont fait l'objet d'une procédure de non adhésion pour au moins l'un des paramètres requis. Parmi les dossiers analysés par l'ECHA, 75% utilisent l'approche « *read-across* » ou l'approche par catégorie pour au moins un des paramètres requis, 51% utilisent l'approche par 'poids de l'évidence' pour les paramètres de toxicité répétée (i.e. toxicité sub-chronique, développement prénatal, reprotoxicité) et 22% utilisent une approche par modélisation ou (Q)SAR.

L'ECHA supporte activement l'utilisation de méthodes *in vitro* pour satisfaire les exigences des annexes, en soutenant notamment l'OCDE dans la validation des tests *in vitro* (ou *in chemico*) et en collaborant avec l'EURL ECVAM pour développer des stratégies de tests intégrés (cas de l'irritation/corrosion oculaire et cutanée et depuis 2015 de la sensibilisation cutanée). Pour la toxicité répétée, l'ECHA soutient le projet SEURAT-1 (Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing). Il en est de même pour la toxicité de la reproduction avec l'approbation en 2013 du test FET (Fish Embryo Toxicity) (OCDE 236).

Entre 2011 et 2014, l'ECHA a continué à mettre à jour les guides pratiques, en particulier sur les modalités d'élaboration d'un rapport sur les données *in vitro* (Guide 1), sur les données (Q)SAR (Guide 5) et sur le regroupement de substances et les méthodes de références croisées (Guide 6) et à organiser des séminaires de formation et d'échanges pour les experts des états membres et les industriels.

► **La réglementation européenne 1272/2008 relative à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges**

Les fabricants, importateurs et utilisateurs en aval d'une substance identifient les informations pertinentes disponibles afin de déterminer si cette substance comporte un danger physique, un danger pour la santé ou un danger pour l'environnement. Les éléments suivants doivent en particulier être recueillis (Article 6) :

- Les données obtenues conformément au règlement REACH, pesticide ou biocide
- Les données basées sur des principes scientifiques fondés reconnus au niveau international,
- Les données basées sur des méthodes validées selon les procédures internationales,
- Les données épidémiologiques humaines, telles que les données professionnelles, issues d'accidents ou de l'expérience acquise en la matière.

¹⁵ The Use of Alternatives to Testing on Animals for the REACH Regulation"- Second report - under Article 117(3) of the REACH Regulation 2014

3. CAS DES PRODUITS COSMETIQUES

► *Le Règlement 1223/2009*

L'article 18 du règlement 1223/2009 interdit, dans la Communauté Européenne l'expérimentation animale pour évaluer la sécurité des produits cosmétiques ou de leurs ingrédients. Cette interdiction est en vigueur pour les produits finis depuis septembre 2004 et depuis mars 2009 pour les ingrédients.

Un report jusqu'au 11 mars 2013 avait été accordé dans le cas des paramètres de toxicité complexes comme la toxicité par applications répétées, la repro-toxicité, la toxicocinétique et la sensibilisation¹⁶. La sécurité d'un produit cosmétique est évaluée sur la base du profil toxicologique des ingrédients, leur structure chimique et le niveau d'exposition pour les consommateurs. Les méthodes alternatives, y compris les méthodes basées sur le regroupement de substances et références croisées ou le 'poids de la preuve', sont préconisées. Malgré cette volonté, l'annexe VIII du règlement 1223/2009, qui liste les méthodes alternatives validées à l'expérimentation animale, est toujours vide.

La Commission Européenne a publié le 11 mars 2013 une communication (COM (2013) 135) sur le maintien de cette interdiction, même lorsque des méthodes de substitution à l'expérimentation animale ne sont pas disponibles. Le rapport indique : « Dans d'autres actes législatifs, l'Union reconnaît qu'en l'absence de méthodes substitutives, il est encore nécessaire de recourir à l'expérimentation animale pour garantir la protection de la santé humaine et de l'environnement ; elle impose cependant des normes très élevées de bien-être animal et requiert que les essais sur les animaux soient, dans la mesure du possible, remplacés, réduits et affinés ». La Commission estime que l'expérimentation animale clairement motivée par le respect de législations ne s'appliquant pas aux produits cosmétiques ne devrait pas être considérée comme ayant été effectuée 'afin de satisfaire aux exigences de la directive/règlement cosmétique européen' » et dans ce cas, ne pas entraîner l'interdiction de mise sur le marché des produits cosmétiques concernés. En effet, les ingrédients utilisés dans les produits cosmétiques sont aussi soumis aux exigences du règlement REACH et, dans le cas de ce règlement, l'expérimentation animale peut être utilisée s'il n'existe aucune autre solution. Ce sont donc les États membres qui doivent décider si l'expérimentation animale effectuée au titre d'autres législations doit être considérée comme relevant de l'interdiction de mise sur le marché de 2013.

4. CAS DES MEDICAMENTS

► *Les médicaments à usage humain*

Le secteur pharmaceutique est largement tributaire des essais chez les animaux pour évaluer l'efficacité des médicaments et leur toxicité. L'expérimentation animale est présente dans la phase de recherche et dans la phase de développement préclinique ; cependant, les données obtenues chez l'animal peuvent être utilisées jusqu'à la phase de pharmacovigilance, c'est à dire au sein des plans de gestion de risques des médicaments demandés aux laboratoires depuis 2004. Les études requises préalablement à une première administration chez l'Homme sont de trois types : les études de pharmacologie qui établissent la validité du concept thérapeutique et son applicabilité chez l'Homme, celles de toxicologie qui évaluent la sécurité d'utilisation du produit : ces études permettent d'établir le rapport bénéfice/risque et de prendre la décision de l'administration à l'Homme. Enfin les

¹⁶ Alternative (non animal) methods for cosmetic testing: current status and future prospects – 2010 – Archives of Toxicology (2011) 85: 367-485

études de pharmacocinétique et de métabolisme déterminent le devenir du médicament dans l'organisme des animaux (transposable à l'Homme) et aident à choisir la première dose à administrer chez l'Homme.

Les approches *in vitro* sont également largement utilisées lors des études précliniques (test de mutagenèse, identification métabolique et prédiction d'interactions médicamenteuses à partir de modèles hépatiques humains).

Les études chez l'animal ont considérablement évolué ces dernières années : le passage aux Bonnes Pratiques de laboratoire (BPL) et l'harmonisation internationale des programmes de toxicologie (Programme ICH) ont permis d'éviter de reproduire des essais ou de conduire des essais inutiles, tout en assurant une meilleure validation et une meilleure reconnaissance internationale.

L'industrie pharmaceutique développe de plus en plus des outils *in vitro* permettant des études mécanistiques. La dernière décennie a été marquée par l'arrivée des méthodes de génomiques et des outils *in silico* permettant de dépister des toxicités de façon très précoce.

Il faut aussi souligner l'initiative européenne IMI¹⁷ (Innovative Medicines Initiative), qui est la plus large initiative publique/privée pour le développement de médicaments innovants et plus sûrs. Pour la première fois, les industries pharmaceutiques ont été réunies pour partager leurs données au sein d'un consortium (e-Tox). Cela va aboutir à la plus grande base de données mondiale reliant, entre autres, la structure chimique à la toxicité. Cette initiative devrait faire évoluer le besoin en termes d'animaux de laboratoire à la baisse.

A noter également les avancées réalisées dans le domaine des essais appliqués aux vaccins. En Europe, la production et le contrôle qualité des médicaments à usage humain représentent une part non négligeable (11%) de la totalité des animaux utilisés expérimentalement. Afin de se conformer à la Directive 2010/63/UE, la Direction Européenne de la Qualité des Médicaments et des Soins de Santé (DEQM) du Conseil de l'Europe œuvre depuis plusieurs années à la conception, mise en place et application d'une stratégie de Réduction, Raffinement/optimisation et Remplacement « stratégie 3R » des essais sur animaux¹⁸.

► **Les médicaments vétérinaires**

Les médicaments vétérinaires sont réglementés par le Code de la santé publique qui transpose la Directive 2001/82 modifiée. Le dossier de demande d'AMM d'un médicament vétérinaire contient les données expérimentales et analytiques prouvant la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament proposé. La partie " sécurité " se décompose en deux sous-parties : " innocuité ", rassemblant les données toxicologiques permettant l'analyse du risque pour l'animal, l'utilisateur et l'environnement et " résidus ", présentant la pharmacocinétique des résidus et leurs méthodes d'analyse. La partie " efficacité " expose les essais précliniques (pharmacodynamie, pharmacocinétique, tolérance, résistance) réalisés en laboratoire, et les essais cliniques, réalisés en station expérimentale ou en laboratoire, puis à plus grande échelle sur le terrain dans des conditions normales d'emploi. A noter pour le médicament vétérinaire, les essais cliniques équivalents aux essais de phase I et II chez l'Homme sont généralement effectués en station sur l'espèce cible et donc comparables à ceux-ci, ce qui les éloigne du concept d'expérimentation animale ; en outre ces essais sont

¹⁷ M. Gunn, E Vaudano and M Goldman. The rationale use of animals in drug development: Contribution of the innovative medicines initiative. ATLA 40, 307-312, 2012

¹⁸ FRANCOPA Newsletter n°2

particulièrement prédictifs puisqu'effectués sur l'espèce cible (pertinence du choix de l'espèce). Les essais doivent être conduits en conformité avec des lignes directrices spécifiques et des codes de bonnes pratiques (BPL et BPC) et respecter les règles de protection animale décrites dans le Code rural.

La directive 2010/63/UE a modifié de manière conséquente l'approche de l'expérimentation et son contrôle. De la même manière que pour le vaccin à usage humain, La DEQM promeut les 3R par la révision de la Pharmacopée Européenne afin de réduire les essais sur animaux (ex. en 2013, suppression dans les monographies de vaccins vétérinaires de l'essai d'innocuité de lot), mais également, dans le cadre du programme de standardisation biologique, par des études sur des méthodes alternatives aux essais *in vivo* (ex. remplacement des souris par des cultures cellulaires comme révélateur de toxicité dans le contrôle des vaccins clostridiens – étude BSP130) ou des méthodes réduisant la souffrance animale (contrôle sérologique d'activité des vaccins rabiques – étude BSP115).

5. LES AUTRES REGLEMENTATIONS

► *Les dispositifs médicaux (DM) et dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* (DMDIV)*

La mise sur le marché des dispositifs médicaux (DM) est réalisée sous la responsabilité de leur fabricant après que soit apposé le marquage CE, témoin de la conformité aux exigences essentielles de santé et de sécurité fixées par les directives européennes.

Le marquage CE s'appuie sur les normes harmonisées européennes qui sont détaillées dans l'annexe I de la Directive 93/42/CEE pour les DM et dans la Directive 98/79/CE pour les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* (DMDIV). Les DM sont répartis en 4 classes en fonction du niveau de risque qu'ils présentent. Selon le type de DM, les exigences réglementaires sont plus ou moins contraignantes et les différents essais nécessaires ont par conséquent certaines spécificités.

La sécurité des DM et DMDIV est encadrée par des normes générales et spécifiques européennes (CEN) et internationales (ISO), relayées au niveau national par l'AFNOR, leur évaluation biologique ayant recours à l'expérimentation animale figure dans la norme ISO 10993 qui comporte 18 parties, dont la partie 2 qui décrit les exigences relatives à la protection des animaux et la partie 5 qui est basée sur l'utilisation de cultures cellulaires pour évaluer la cytotoxicité de nombreux DM. A noter la mise en place d'un règlement européen qui impose de revoir les tests de sécurité des DM intégrant les exigences de la directive 2010/63/UE.

► *Les produits phytopharmaceutiques*

Les produits phytopharmaceutiques sont utilisés pour protéger les espèces végétales cultivées (ou les produits végétaux) contre les organismes nuisibles ou pour exercer une action sur les processus vitaux des végétaux. On distingue essentiellement trois familles : les herbicides, les fongicides et les insecticides.

L'évaluation des produits phytopharmaceutiques et des substances actives qu'ils contiennent, est régie par le règlement européen 1107/2009 CE du 21/10/2009 (abrogeant les directives 91/414/CEE et 79/117/CEE depuis le 14 juin 2011). Les informations fournies doivent permettre une évaluation des dangers et des risques liés à l'utilisation du produit concerné, ainsi qu'une évaluation de son efficacité et de sa sélectivité (effet sur les organismes non cibles).

Plus particulièrement, l'évaluation toxicologique est destinée à évaluer les risques pour différentes populations humaines : les opérateurs et les travailleurs agricoles directement exposés (personnes qui appliquent les traitements ou qui travaillent sur l'exploitation après traitement), les personnes passant à proximité lors de l'application, les personnes résidant à proximité des espaces traités et les consommateurs. Les études toxicologiques conduites dans ce cadre réglementaire suivent les lignes directrices et les documents guides de l'OCDE. Ces textes visent à réduire les risques et les conséquences de l'utilisation des pesticides pour la sécurité humaine et pour l'environnement. Le règlement 1107/2009 CE prévoit en particulier une diminution des essais sur vertébrés et encourage l'utilisation des méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Certaines études obligatoires sous la Directive 91/414/CEE sont conduites uniquement si les résultats s'avèrent indispensables pour l'extrapolation à l'homme (étude un an sur chien OCDE 452 par exemple), d'autres sont remplacées par des tests *in vitro* (études d'irritation cutanée et oculaire). De nouvelles études sont requises afin d'affiner l'évaluation toxicologique ; il convient en effet de réaliser des études comparatives *in vitro* du métabolisme sur des espèces animales, qui seront utilisées comme études pivot afin de déterminer la pertinence des données toxicologiques.

► **L'évaluation des produits Biocides**

Les produits biocides sont destinés à détruire, repousser, ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, en prévenant leur action ou à les combattre par une action chimique ou biologique. Ils sont régis par le règlement (UE) N° 528/2012 du 22 mai 2012 applicable depuis le 1er septembre 2013 et qui remplace la Directive N°98/8/CE du 26 février 1998. Le règlement définit 22 types de produits biocides répartis en quatre groupes que sont les désinfectants, les produits de protection, les produits de lutte contre les nuisibles et les autres produits biocides. Ce règlement vise à harmoniser la réglementation des Etats membres de l'Union européenne sur l'utilisation de ces produits et de garantir l'unicité du marché.

L'objectif principal est de garantir un niveau de protection élevé pour la santé humaine, les animaux et l'environnement tout en assurant la libre circulation des produits biocides sur le territoire européen. Les règles, relatives à la mise à disposition sur le marché, prévoient que seuls les substances actives et les produits biocides efficaces et présentant des risques acceptables pour l'Homme et l'environnement soient mis sur le marché et utilisés.

Ainsi, la mise en œuvre du règlement inclut une évaluation des substances actives biocides aboutissant à un règlement d'approbation (un couple substance active/type de produit), si la substance active remplit les critères réglementaires, et une évaluation des produits contenant des substances actives préalablement approuvées qui peut déboucher sur une autorisation. La Commission européenne dresse et tient à jour une liste positive des substances actives approuvées au niveau communautaire. Les autorisations de produits biocides sont délivrées soit par les Etats membres, soit par l'Union Européenne et sont valables seulement dans le pays qui a délivré l'autorisation ou le territoire de l'Union Européenne, respectivement. Le processus d'évaluation inclut une évaluation du danger, une évaluation de l'exposition de l'Homme, des animaux et de l'environnement lors de l'utilisation de ces produits, une évaluation de l'efficacité.

Enfin, le règlement prévoit des dispositions pour la protection des données et incite les industriels à partager les données. Les essais sur vertébrés ne sont réalisés qu'en dernier recours, et ces essais ne sont pas répétés aux fins du règlement sur les produits biocides.

► Les additifs alimentaires

Les lignes directrices concernant le contenu général des dossiers d'autorisation des additifs, enzymes et arômes alimentaires ont été revues dernièrement dans le document de la DG Sanco « *Practical Guidance for applicants on the submission of applications on food additives, food enzymes and food flavourings – version 7 – updated on the 27 May 2014* ». Ce document fait référence à d'autres documents prenant en compte les exigences spécifiques à chacune des catégories spécifiques d'agents d'amélioration de denrée alimentaire, ci-dessus énumérées, et détaillées ci-dessous.

Additifs alimentaires :

Une approche par étapes, est considérée dans la nouvelle ligne directrice d'Aout 2012 [EFSA Journal 2012;10(7):2760] : elle permet d'établir un juste équilibre entre le panel d'essais à réaliser sur animaux et le risque encouru. Cette nouvelle approche établit un dataset de base commun à toute substance, et des essais complémentaires à réaliser pour les substances qui sont absorbées et/ou qui démontrent un caractère génotoxique.

Elle recommande de plus d'adopter les procédures expérimentales de l'OCDE, de réaliser les études conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) et de respecter le principe des 3R.

Enzymes Alimentaires :

La seule ligne directrice disponible aujourd'hui sur la constitution des dossiers d'autorisation des enzymes alimentaires date de Juillet 2009 [EFSA Journal (2009) 1305, 1-26]. Contrairement, à la ligne directrice concernant les additifs alimentaires, aucune recommandation n'est faite sur le respect du principe Règle des 3R, bien que, à la même période, l'EFSA publiait son avis générique sur les méthodes alternatives en expérimentation animale¹⁹.

Le niveau d'informations toxicologiques à fournir est très largement dépendant de l'enzyme considérée, de son origine et du niveau d'exposition du consommateur mais il est considéré qu'en première approche, en l'absence de données prouvant un historique d'utilisation sûre de l'enzyme considérée, l'évaluation de sa toxicité systémique est nécessaire.

Arômes Alimentaires :

La seule ligne directrice disponible aujourd'hui sur la constitution des dossiers d'autorisation des enzymes alimentaires date de Juillet 2010 [EFSA Journal 2010; 8(6):1623]. Egalement dans le cas des arômes alimentaires, aucune référence n'est faite au principe des 3R. Néanmoins, l'approche utilisée pour les arômes alimentaires chimiquement définis, est également une approche par étape qui limite intrinsèquement les essais sur animaux, dans la mesure où les données d'exposition (généralement faibles), données sur la similarité de structure / activité par rapport à d'autres arômes/substances et sur la nature des métabolites générés sont exploitées avant d'avoir recours, si nécessaire, à des essais sur animaux. Les données de génotoxicité sont néanmoins indispensables à toute évaluation mais là aussi les tests *in vivo* ne s'imposent que pour lever un doute sur le caractère génotoxique d'une substance suite aux essais *in vitro*.

¹⁹ A rappeler en effet que le Comité scientifique de l'EFSA a publié en juillet 2009 un avis sur les méthodes alternatives en expérimentation animale et leurs utilisations dans le domaine de la sécurité de l'alimentation humaine et animale (The EFSA Journal (2009) 1052, 6-77). Cet avis constitue un examen approfondi des principes directeurs relatifs à l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales. Il résume les possibilités de remplacement, de réduction et d'amélioration des essais sur les animaux dans les différents domaines d'activité de l'EFSA.

Nanomateriaux :

Une ligne directrice spécifique aux nanomatériaux manufacturés utilisés dans le domaine de l'alimentaire humaine (qu'ils soient ajoutés directement ou indirectement par le biais des matériaux au contact des aliments), a vu le jour en 2011 [EFSA Journal 2011;9(5):2140].

L'autorisation de telles substances repose sur un panel de tests toxicologiques qui inclue généralement des tests de génotoxicité *in vitro*, des données ADME et des résultats d'études de toxicité sub-chronique sur rongeurs. Aucune dérogation n'est prévue au panel des tests à réaliser sauf dans le cas où il est démontré que les nanomatériaux de désintègrent et ne sont pas consommés tels quels ou qu'ils ne migrent pas du matériau vers les aliments. De même, aucune référence n'est faite au principe des 3R.

► **Les matériaux à contact alimentaire**

Les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires sont réglementés par le règlement cadre Européen 1935/2004. Ce règlement impose aux industriels à travers l'article 3, le principe d'inertie des matériaux à contact des denrées alimentaires (MCDA) notamment : « les emballages ne doivent pas céder aux denrées alimentaires, dans les conditions normales ou prévisibles de leur emploi, des constituants en une quantité susceptible de présenter un danger pour la santé humaine... ».

Des directives ou règlements spécifiques existent selon le type de matériaux comme par exemple pour les plastiques (règlement Européen 10/2011). Ainsi, pour une faible migration d'une substance de départ, seule une batterie de tests *in vitro* (tests de mutagénèse) est exigée par l'EFSA. Les MCDA peuvent également contenir des substances non intentionnelles (SNI) qui sont des impuretés, produits de décomposition ou de réaction. La migration faible mais mesurable des SNI pouvant entraîner aussi un risque pour la santé humaine, le règlement Européen 10/2011 en fait aussi mention : « l'évaluation du risque engendré par une substance porte sur la substance elle-même, sur les impuretés pertinentes et sur les produits de réaction ou de dégradation prévisibles dans le cadre de l'utilisation envisagée etc. ».

A ce jour, l'évaluation et la gestion des risques liée au SNI est difficile car ces substances ne sont pas toujours prévisibles et identifiées. Ces inconvénients peuvent être surmontés par l'utilisation de tests *in vitro* sur les migrants d'emballage en complément des méthodes d'analyse chimique afin de détecter des effets cytotoxiques, génotoxiques et de perturbation endocrinienne ou un effet mélange à faible dose (potentialisation, synergisme, etc.). Ces tests *in vitro* précoces et à court terme permettent aussi de choisir les tests ultérieurs à mener quand un effet indésirable est observé.

A titre d'exemple, en France, le Département de Recherches et de Transferts Technologiques « **Packtox** » de l'Université de Bourgogne/AgroSupDijon a développé des méthodes alternatives *in vitro*, basées sur une réponse biologique globale, pour l'évaluation du danger lié à des migrants de MCDA.

► **Les Organismes Génétiquement Modifiés**

Deux directives européennes réglementent la mise sur le marché des OGM, la Directive 2009/41/CE (utilisation confinée) et la Directive 2001/18/CE (dissémination volontaire). Ces directives ont été transposées en droit français par la loi du 2008-595 du 25 juin 2008 instaurant, dans son article 3, le Haut Conseil des Biotechnologies chargé de rendre des avis en matière d'évaluation des risques pour l'environnement et la santé publique de toute utilisation d'OGM. Par ailleurs, les OGM destinés à l'alimentation ou pouvant entrer dans la composition des produits alimentaires à destination des hommes ou des animaux sont régis par le règlement (CE) 1829/2003 qui prévoit une procédure d'évaluation unique réalisée par

l'Autorité européenne de sécurité alimentaire (AESA). Dans ce cadre, la procédure d'examen des dossiers comporte une consultation des Etats membres. En France, l'évaluation des risques sanitaires et nutritionnels est confiée à l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Alimentation, Environnement et du Travail (ANSES) qui s'appuie sur son Groupe de Travail "Biotechnologie".

Les dossiers de demande d'autorisation de culture ou d'importation de Plantes Génétiquement Modifiées (PGM) doivent répondre aux exigences de lignes directrices et comporter systématiquement des études sur le rongeur concernant la toxicité orale aiguë des protéines exprimées dans la PGM et la toxicité orale subchronique (90j) de la plante ou partie de plante consommée. S'y ajoute un test d'alimentarité sur une espèce cible, le plus souvent le poulet.

Par ailleurs, sur la base des directives de l'OMS-FAO du *Codex Alimentarius* et de l'EFSA, l'évaluation du risque d'allergénicité prévoit, pour les protéines transgéniques, la recherche *in silico* d'homologies de séquences avec des allergènes connus. En cas de doute, une recherche de réactivité croisée entre les IgE de sujets allergiques dirigées contre une protéine identifiée comme présentant un certain degré d'homologie et des IgE dirigées contre la protéine transgénique est réalisée. Par ailleurs la sensibilité des protéines transgéniques à la dégradation protéolytique du milieu digestif (milieu gastrique ou intestinal reconstitué) est évaluée. Au préalable, le risque d'allergénicité de l'organisme donneur du transgène est également pris en compte.

► **Les Phycotoxines²⁰**

Le règlement CE N° 853/2004 (annexe III, section VII, chapitre V) figurant dans le Paquet Hygiène indique les limites pour les biotoxines marines dans les mollusques bivalves vivants. Le règlement européen n°15/2011 du 10 janvier 2011 a introduit l'approche analytique pour les toxines lipophiles, la méthode CL-SM/SM validée aux niveaux national et européen s'appliquant aux 4 familles de toxines lipophiles réglementées, officialisant le remplacement du bio-essai sur souris (BES) en tant que méthode de référence. En France, le BES a cependant été conservé et intégré dans un système de vigilance, une fois par mois sur 10 points de références répartis le long du littoral français, dans le but de mettre en évidence la présence de toxines lipophiles émergentes (toxines inconnues, nouveaux analogues de toxines connues etc.).

Il n'en demeure pas moins que le BES est maintenu comme test de référence pour les toxines paralysantes. Cependant, certaines méthodes de chromatographie liquide ont été validées sous l'égide de l'Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (méthodes AOAC 2005.06 et 2011.02, respectivement). La méthode 2005.06 est même inscrite dans le règlement UE 1664/2006 du 6 novembre 2006 comme alternative au BES et elle est actuellement en cours de normalisation au Comité européen de normalisation (CEN). La méthode AOAC 2011.02 devrait elle aussi être normalisée par le CEN mais la démarche est bien moins avancée. Certains états membres de l'UE ont d'ores et déjà décidé de remplacer

²⁰ Le règlement de la Commission européenne concernant ces biotoxines dans les mollusques bivalves correspond au document Règlement (UE) N°15/2011 de la Commission du 10 janvier 2011 modifiant le règlement (CE) N° 2074/2005 en ce qui concerne les méthodes d'analyse reconnues des biotoxines marines chez les mollusques bivalves vivants (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

(<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:006:0003:0006:FR:PDF>) avec le rectificatif au Règlement (UE) N°15/2011 de la Commission du 10 janvier 2011 modifiant le règlement (CE) N° 2074/2005 en ce qui concerne les méthodes d'analyse reconnues des biotoxines marines chez les mollusques bivalves vivants « *Journal officiel de l'Union européenne* » L 6 du 11 janvier 2011 (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:252:0022:0022:FR:PDF>).

le BES par une méthode CL-Fluo pour l'analyse des toxines paralysantes ; c'est le cas notamment de la Suède, la Finlande, l'Allemagne et le Royaume-Uni.

► **La directive 2000/60/CE du parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau**

Dans le cadre général de sa politique de protection de la santé humaine et des milieux, la commission européenne a édicté dès 2000 une directive établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau (directive 2000/60/CE du parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000). Celle-ci définit une stratégie de lutte contre la pollution de l'eau consistant à recenser des substances prioritaires parmi celles qui présentent un risque significatif pour ou via l'environnement aquatique au niveau de l'Union, à définir des normes de qualité environnementales pour ces substances et à mesurer les niveaux de concentration de celles-ci dans les milieux aquatiques de l'Union.

En particulier cette directive définit le bon état chimique d'une eau de surface comme étant l'état chimique atteint par une masse d'eau de surface dans laquelle les concentrations de polluants ne dépassent pas les normes de qualité environnementale.

Les connaissances sur le devenir des substances chimiques dans l'environnement ayant évolué au cours du temps il est apparu que le suivi de la contamination dans la matrice EAU n'est pas toujours le plus pertinent et pour les substances très hydrophobes, le biote est sans doute plus adapté puisque c'est au sein des organismes vivants que s'accumulent ces contaminants. C'est pourquoi d'ailleurs, la directive fille 2013/39/UE du 12/08/13 modifiant la directive de 2008 sur les normes de qualité environnementales vient renforcer la surveillance dans le biote qui jusqu'ici n'était proposée que pour 3 contaminants. Aujourd'hui, pour une dizaine de substances de la liste européenne, la matrice recommandée est le biote et les normes de qualité environnementales sont proposées pour le poisson. Les travaux d'experts se poursuivent néanmoins pour établir des règles communes sur ces notions. Au sens de ces textes la notion de méthodes alternatives doit être comprise comme le recours à de nouvelles méthodes de surveillance, telles que l'échantillonnage passif ou d'autres outils qui permettront de réduire voire de supprimer l'utilisation d'organismes vivants pour la caractérisation de la contamination chimique des milieux.

III- LES NIVEAUX DE RECONNAISSANCE, DE LA VALIDATION SCIENTIFIQUE A LA VALIDATION REGLEMENTAIRE

1. LA VALIDATION SCIENTIFIQUE

En recherche fondamentale et appliquée, les méthodes alternatives sont utilisables librement, sans contrainte de standardisation. Ces méthodes sont « **reconnues** » par le processus classique de validation par les pairs, c'est-à-dire par leur publication dans des revues scientifiques, et leur utilisation. Ces méthodes « reconnues » du point de vue scientifique peuvent être utilisées par les industriels en amont pour un criblage lors d'un processus de développement de produits ou d'ingrédients en créant un dossier à des fins réglementaires, sous réserve qu'elles soient suffisamment fiable et reproductibles.

Comme exemple nous citerons les tests ER-Calux® et AR-Calux®, modèle cellulaire couplé à la technique du gène rapporteur de la luciférase pour mettre en évidence des effets oestrogéniques ou androgéniques. Le rapport sur l'étude de validation de l'essai ER-alpha CALUX a été publié par l'OCDE en 2016 (Series on testing & Assessment No. 240).

2. LA VALIDATION REGLEMENTAIRE

Pour une utilisation dans un cadre réglementaire, les méthodes alternatives doivent être généralement « **validées** », travail qui commence par celui des instances nationales (ZEBET), européennes (EURL ECVAM) ou internationales (ex. ICATM, ICCVAM, JACVAM). La validation dite « réglementaire » portée par exemple par l'OCDE ou la Pharmacopée Européenne, rend éligible l'utilisation d'une méthode dans un dossier réglementaire.

La validation réglementaire est souvent jugée comme contraignante et longue. Elle comprend plusieurs étapes incluant entre autres la définition précise de la méthode d'un point de vue scientifique (ex. mode d'action décrit grâce à une littérature scientifique abondante), sa robustesse, son intérêt réglementaire, sa capacité à prédire correctement les résultats attendus²¹, et fait intervenir plusieurs acteurs (laboratoires publics et/ou privés et autorités réglementaires).

Cependant, face au besoin croissant de méthodes alternatives et compte tenu du temps nécessaire à la validation « réglementaire », une approche s'inspirant de la normalisation ou de la certification volontaire a été adoptée par le règlement REACH qui permet de faire appel à des méthodes « reconnues » scientifiquement à côté des méthodes validées dans les dossiers réglementaires, cette démarche répondant aux besoins exprimés par les industriels et la société civile.

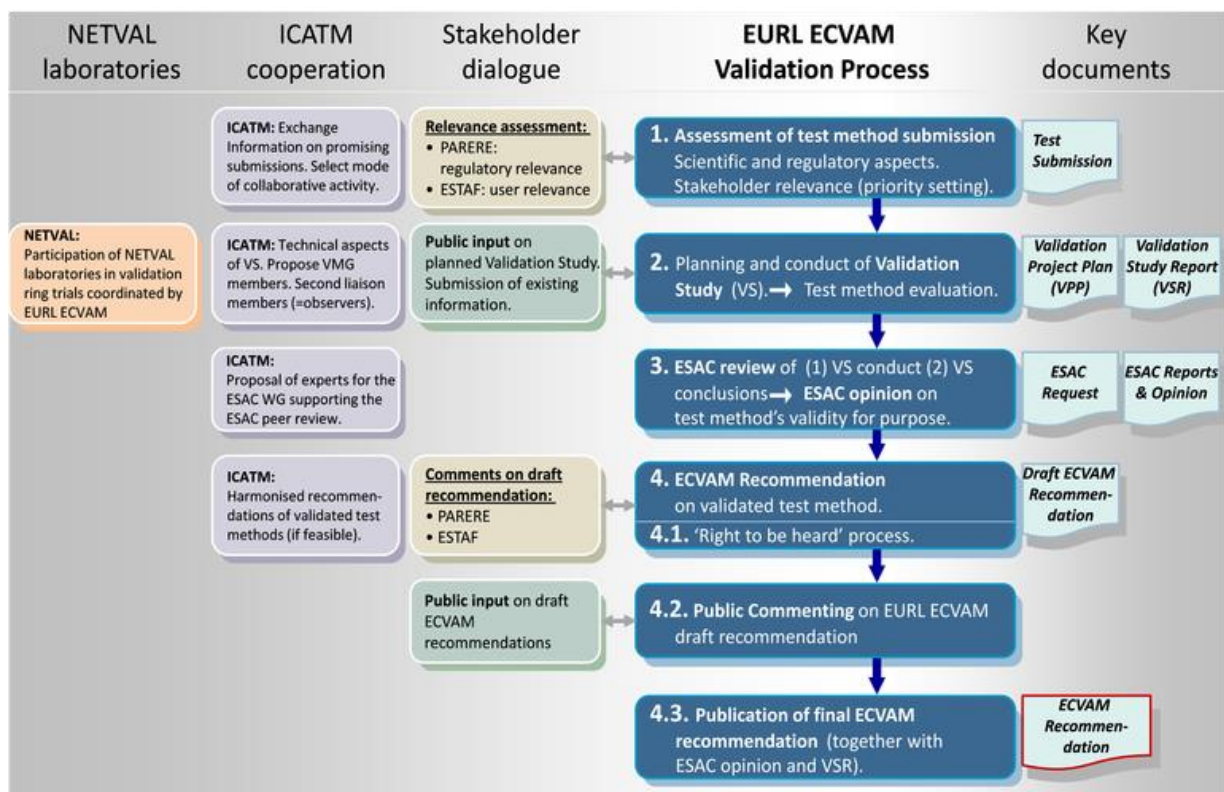
²¹ Guideline n°34 de l'OCDE.

LE PROCESSUS DE LA VALIDATION D'UNE METHODE ALTERNATIVE EURL ECVAM

► En vue d'établir une ligne directrice OCDE pour les essais appliqués aux produits chimiques

L'EURL ECVAM (le Laboratoire Référent de l'Union Européenne pour les Alternatives aux Tests sur Animaux) présenté dans un chapitre précédant (les acteurs/la Commission Européenne) a pour objectif de coordonner la validation des méthodes alternatives à l'expérimentation animale, de les promouvoir et de les disséminer.

Le processus de validation d'une méthode alternative à l'expérimentation animale tel que proposé par EURL ECVAM se déroule en 4 étapes clefs illustrées dans la figure ci-dessous. Le rôle des différentes parties prenantes présentées dans un paragraphe antérieur ainsi que les documents clés élaborés à chaque étape y sont représentés.



https://EURL_ECVAM.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/EURL_ECVAMs-validation-process

Les parties prenantes :

- NETVAL : Réseau européen de laboratoires pour la validation des méthodes alternatives. Ces laboratoires disposent d'infrastructures de tests *in vitro* respectant les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) et sont susceptibles de participer aux études de validation.
- ICATM (International Cooperation on Alternative Tests Methods) : Regroupe les institutions qui s'occupent de validation de méthodes alternatives au niveau international. On y décompte,

les Etats-Unis (ICCVAM, le Canada (Health Canada), le Japon (JaCVAM), la Corée du Sud (KOCVAM) et le Brésil (BRACVAM).

- Le réseau PARERE (Preliminary Assessment of REgulatory Relevance regroupant des représentants des Etats Membres) donne une opinion sur les besoins prioritaires d'une nouvelle méthode alternative en lien avec le contexte réglementaire avant de débiter une validation.
- ESTAF (ECVAM Stakeholder Forum): Regroupe des partenaires publics et privés, et informe EURL ECVAM sur l'intérêt et l'applicabilité des méthodes soumises.
- ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee). L'ESAC conseille l'EURL ECVAM sur les questions scientifiques. Son rôle principal est d'évaluer de manière indépendante les études de validation des méthodes alternatives (validité scientifique, design, qualité des résultats obtenus, etc.). ESAC propose donc une contre-expertise de la validation et recommandera également dans quel contexte réglementaire la méthode validée peut être utilisée.

LES 4 ETAPES DU PROCESSUS DE VALIDATION :

1. Évaluation de la méthode :

Après la soumission officielle de la méthode par l'organisme candidat, une première évaluation est menée à bien par EURL ECVAM quant à la pertinence de la méthode sur les plans scientifique et réglementaire (évaluation du besoin et de l'existence d'autres méthodes équivalentes) et au nombre d'animaux utilisés. Les réseaux PARERE et ESTAF sont également consultés.

Cette étape se déroule en 2 phases : la pré-soumission permet à EURL ECVAM d'évaluer rapidement la pertinence de la proposition tenant compte de la rigueur scientifique et du contexte réglementaire de la méthode. Cette évaluation est discutée avec l'ensemble du personnel impliqué dans le travail de validation de méthodes alternatives. Si l'évaluation est positive, on se dirige vers une deuxième phase qui consiste en un document plus complet (Full Test Submission), détaillant plus précisément l'état de développement de la méthode.

→ Soumission de la méthode à l'étude de validation

2. Planification et conduite de l'étude de validation :

Le plan de validation est établi et l'étude de validation est désormais réalisée par les laboratoires du réseau NETVAL en lien avec leur spécialité. On note toutefois que l'ECVAM ne finance pas les travaux des laboratoires.

→ Plan de validation (VPP) → Rapport de validation (VSR)

3. Evaluation scientifique réalisée de manière indépendante par le Comité consultatif scientifique d'EURL ECVAM (ESAC)

→ Rapport scientifique

4. Elaboration des recommandations par EURL ECVAM :

Le projet de recommandation est dans un premier temps envoyé à l'organisme ayant soumis la demande de validation de l'essai pour d'éventuels commentaires, puis il est mis en ligne pour consultation publique, avant la publication finale de la recommandation sur le site Internet de EURL ECVAM.

L'ADOPTION REGLEMENTAIRE

On peut distinguer 2 niveaux : communautaire (EU) et international (ICATM ou OECD).

L'EURL ECVAM (DG JCR) travaille en coopération avec le directeur général de l'environnement (DG ENV) au sein de la Commission européenne. DG ENV sera l'interface avec les Etats membres pour faire adopter la nouvelle méthode alternative dans la réglementation européenne (EC 440/2008 EC ou dernièrement amendé EU/900/2014). Ce

règlement regroupe les tests reconnus par les agences réglementaires nationales dans le cadre de l'évaluation du risque même si initialement prévu uniquement dans le contexte de REACH.

L'EURL ECVAM travaille également via ICATM en coopération avec ses homologues, américain (ICCVAM - Interagency Co-ordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), Japonais (JaCVAM), Canadien (Health Canada), Coréen (KoCVAM) et brésilien (BRACVAM) afin de garantir un échange rapide d'informations sur la validation de méthodes et pour faciliter la reconnaissance mutuelle, l'acceptation et l'application de méthodes scientifiquement validées.

L'objectif est aussi de participer aux efforts communs visant à faciliter les travaux de l'OCDE concernant l'établissement de procédures harmonisées pour la communauté scientifique et la promotion de l'adoption, au niveau international, de méthodes de substitution validées.

L'EURL ECVAM a schématisé une partie de ces informations sur le site internet suivant : <http://tsar.jrc.ec.europa.eu/>

► **En vue d'établir une monographie de la Pharmacopée Européenne**

Le processus de validation d'une méthode 3R qui s'applique au contrôle de la qualité des produits de santé s'appuie sur le processus défini par l'ECVAM et est basé sur le guide OCDE n°34. Il concerne les lignes directrices qualité ou non cliniques.

Au niveau européen, le Programme de Standardisation Biologique (BSP) mise en œuvre par la DEQM a pour objet de valider de nouvelles méthodes appliquées au contrôle de la qualité des médicaments biologiques afin de les introduire dans la Pharmacopée Européenne. Ce Programme est supervisé par un Comité Directeur composé des présidents des groupes de la Pharmacopée Européenne, d'experts compétents, de représentants des groupes de travail de l'EMA (European Medicines Agency) et d'un observateur de l'OMS (Organisation Mondiale pour la Santé).

3. Les méthodes validées par les instances réglementaires

► **Les méthodes substitutives applicables aux substances chimiques (tableau 1)²²**

Des méthodes alternatives à l'expérimentation animale, validées et adoptées par l'OCDE existent dans les domaines de la corrosion (3 tests) et de l'irritation cutanée (1 test), de l'irritation oculaire sévère (2 tests), de la sensibilisation (2 tests), de la photo-toxicité (1 test), pour évaluer les effets mutagènes et génotoxiques (6 tests), pour déterminer l'absorption cutanée (1 test) ainsi que pour évaluer un potentiel reprotoxique (3 tests), ou encore en écotoxicologie (1 test). Ces tests de substitution, les seuls à être juridiquement acceptés au niveau communautaire, visent à remplacer l'expérimentation animale pour les essais toxicologiques dans le domaine des substances chimiques et des produits cosmétiques.

Ils sont très utilisés en France depuis plus de 10 ans par le secteur cosmétique, les industriels du domaine ayant largement contribué à la conception et à la validation de ces méthodes.

Des stratégies de réduction de la souffrance des animaux et du nombre d'animaux utilisés ont été adoptées par l'OCDE et appliquées à certains tests d'évaluation de la toxicité aiguë, de la sensibilisation cutanée, ou encore de la mutagenèse. Il n'existe pas à ce jour de

²² EURL ECVAM Status report on the development, validation and Regulatory acceptance of alternative methods and approaches (Septembre 2015)

méthodes ou stratégies alternatives à l'expérimentation animale dans les domaines de la repro-toxicité, des toxicités chroniques, de la cancérogenèse, domaines qui nécessitent la mise en œuvre de tests toxicologiques les plus consommateurs d'animaux. Se rapprochent toutefois du sujet, l'étude des mécanismes perturbateurs (deux tests sur cellules adopté en septembre 2009 et 2012 pour la détection des perturbateurs endocriniens de type œstrogénique). On notera toutefois le travail sur les essais de repro-toxicité pour limiter le nombre de situations où l'on suit deux générations de descendants, avec l'acceptation d'une ligne directrice en 2011 (TG 443).

PROPRIETE ETUDIEE	METHODE(S) SUBSTITUTIVE(S)	MODELE UTILISE
CORROSION CUTANEE	1. Essai de résistance électrique transcutanée (TG OCDE 430) 2. Essai sur modèle de peau humaine (TG OCDE 431) 3. Méthode d'essai <i>in vitro</i> sur membrane (TG OCDE 435)	1. Explant de peau de rat 2. Epiderme 3D 3. Membrane acellulaire
IRRITATION CUTANEE	1. Irritation cutanée <i>in vitro</i> : essai sur épiderme humain reconstitué (TG OCDE 439)	1. Epiderme reconstitué
IRRITATION OCULAIRE	1. Méthode <i>ex vivo</i> – BCOP (TG OECD 437) 2. Méthode <i>ex vivo</i> – ICE (TG OECD 438) 3. Essai de diffusion de fluorescéine sur cellules MDCK (TG OCDE 460) 4. Essai de cytotoxicité (TG OECD 491) 5. Essai de cytotoxicité sur épithélium cornéen reconstitué (TG OECD 492)	1. Cornée bovine 2. Œil isolé de poulet 3. Cellules 4. Cellules 5. Modèle 3D
SENSIBILISATION CUTANEE	1. Méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase (TG OCDE 442C) 2. Essai de liaison directe sur la réactivité peptidique (DPRA) (TG OCDE 442D)	1. Cellules 2. Peptide modèle
MUTAGENESE/ GENOTOXICITE	1. Essai de mutation reverse (TG OCDE 471) 2. Essai de mutation génique (TG OCDE 481) 3. Essai d'aberration chromosomique <i>in vitro</i> (TG OCDE 473-475) 4. Essai <i>in vitro</i> de mutation génique (TG OCDE 476) 5. Essai <i>in vitro</i> d'échange de chromatides sœurs (TG OCDE 479) 6. Essai des micronoyaux sur cellules (TG OCDE 487) 7. Essai <i>in vitro</i> de mutation génique/TK (TG OCDE 490) 8. Essai <i>in vitro</i> (TG OCDE 493)	1. Bactéries 2. Bactéries 3. Cellules 4. Cellules 5. Cellules 6. Cellules 7. Cellules 8. Récepteur
REPROTOXICITE (PERTURBATEUR ENDOCRINIEN)	1. Essai <i>in vitro</i> de transactivation par transfection stable visant la détection des substances agonistes des récepteurs des œstrogènes (TG OCDE 455) 2. Essai de stéroïdogénèse H295R (TG OCDE 456) 3. Essai de transactivation faisant appel au récepteur des œstrogènes BG1Luc pour la détection des agonistes ou antagonistes des récepteurs des œstrogènes (TG OCDE 457)	1. Cellules 2. Cellules 3. Cellules
ABSORPTION CUTANEE	1. Méthode <i>in vitro</i> (TG OCDE 428)	1. Explant de peau (humaine et de rat <i>ex-vivo</i>)
PHOTO-TOXICITE	1. Essai de photo-toxicité 3T3 NRU (TG OCDE 432)	1. Cellules
ECOTOXICOLOGIE	1. Méthode <i>in vitro</i> – FET (TG 236)	1. Oeufs de poisson-zèbre

Tableau 1 : Bilan des méthodes alternatives réglementaires appliquées aux substances chimiques (dont les ingrédients des produits cosmétiques). Ces méthodes font l'objet de Lignes Directrices (Test Guidelines, TG), identifiées par un Code international par l'OCDE <http://www.oecd-ilibrary.org>.

► **Les méthodes substitutives applicables au contrôle des produits de santé humaine et animale (tableau 2)**

Les monographies de la Pharmacopée Européenne²³ :

Un programme de standardisation biologique a été mis en place en 1994 par la DEQM afin d'établir des standards appliqués au Contrôle Qualité des médicaments biologiques (vaccins, sérums, toxines, produits sanguins, produits biotechnologiques). Seize projets sur les 96 mis en œuvre dans le cadre de ce programme sont dédiés aux méthodes 3R, l'objectif final étant de publier les procédures validées. Ainsi les méthodes suivantes sont l'objet de monographies de la Pharmacopée européenne ayant pour objectif le remplacement de l'animal :

METHODE SUBSTITUTIVE	REPLACEMENT DE :	PRODUITS CONCERNES
Test de recherche d'endotoxines bactériennes (LAL) (2.6.14)*	Test des pyrogènes chez le lapin (2.6.8)	- Vaccins humains - Produits sanguins - Produits biotechnologies - Antibiotiques - Radiopharmaceutiques
Toxicité générale : Suppression de tests inutiles si preuve apportée de la régularité de la production	Toxicité anormale chez la souris et le cobaye (2.6.9 et Monographie générale 0062) Test de recherche de substances <ul style="list-style-type: none"> • Histaminiques (2.6.8) • Hypotensives (2.6.11) 	- Vaccins humains et vétérinaires - Produits sanguins - Produits biotechnologies - Antibiotiques
Tests de sécurité : Test de toxicité sur culture cellulaire Suppression de tests inutiles si preuve apportée de la régularité de production	Test d'absence de toxicité et d'irréversibilité de la toxine diphtérique chez le cobaye (Monographie générale 0443) Test de toxicité spécifique tétanique et diphtérique sur cobaye Test d'immunogénicité sur souris du vaccin polysaccharidique conjugué Haemophilus influenzae	- Vaccins humains
Tests d'activité* : 1. Quantification des antigènes 2. Test de contrôle d'activité du vaccin antivariolique sur culture cellulaire	1. Test sérologique d'activité du vaccin contre la poliomyélite (inactivé) chez le rat 2. Test de contrôle d'activité du vaccin antivariolique sur œufs	- Vaccins humains
Dosages physico-chimiques (HPLC)	Bioessais chez la souris	- Hormones
Dosage de l'Antigène par ELISA dans le vaccin*	Tests sérologiques	- Vaccins Hépatites A et B - Vaccin vétérinaire « New Castle Disease »

* **Sous réserve de validation par le laboratoire désirant remplacer le test in vivo par le test in vitro**

Tableau 2 : Bilan des méthodes substitutives réglementaires appliquées au contrôle de la qualité des médicaments biologiques (Monographies de la Pharmacopée européenne).

²³ Deuxième Newsletter FRANCOPIA « Contribution et application par l'ANSM de la stratégie 3R dans le cadre de la libération des médicaments immunologiques à usage humain ».

Il est important de noter que les efforts d'harmonisation des pratiques en expérimentation au niveau européen et international, dans le domaine du médicament (travaux ICH) ainsi que le passage à des méthodes de production présentant moins de sources de risques ont permis de remplacer certains bioessais réalisés sur l'animal par des méthodes physico-chimiques, (ex : les protéines recombinantes). De même, le test de toxicité anormale destiné à identifier le défaut de fabrication d'un produit de santé est abandonné dans la plupart des cas grâce à la mise en place des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

► **Les méthodes validées peu ou pas utilisées**

Certaines méthodes adoptées par les instances réglementaires ou validées sont finalement peu utilisées. Il s'agit essentiellement de méthodes qui sont destinées aux secteurs industriels (ex : test d'embryotoxicité : Embryonic Stem Cell Test, EST, validé par l'ECVAM).

Cet échec a été constaté par les groupes de travail de l'EPAA. Plusieurs causes ont été identifiées :

- L'utilisation pratique de la méthode après la validation scientifique met en évidence une mauvaise prédictivité (taux de faux positifs/faux négatifs). En effet l'analyse rétrospective des résultats obtenus avec la méthode validée peut remettre en cause la pertinence du test,
- Ces méthodes ne sont pas adaptées aux exigences réglementaires. Lors de sa première conférence en 2005, l'EPAA a largement débattu de cette problématique dont la cause est essentiellement l'absence d'implication des acteurs réglementaires en amont du processus de validation. Depuis 2013, le nouvel outil de la Commission Européenne, EURL ECVAM a mis en place un processus de validation plus efficace et plus adapté aux besoins des différentes réglementations.
- Les méthodes adoptées par l'Europe (EURL ECVAM, Pharmacopée européenne) ne sont pas toujours reconnues au niveau international (ex : vaccins, le test des pyrogènes chez le lapin est toujours exigé par les pays asiatiques²⁴). La coopération internationale mise en place dans tous les secteurs vise une harmonisation des pratiques et des tests réglementaires 3R à l'échelle mondiale.

Finalement, à part la réglementation sur les produits cosmétiques qui par défaut oblige l'utilisation de méthodes alternatives pour générer de nouvelles données toxicologiques depuis mars 2013, on constate que les réglementations européennes (par ex. REACH ou pesticides) sont peu contraignantes. Les lois européennes en général sollicitent et demandent à l'industriel de privilégier les méthodes alternatives mais cela reste avant tout un choix. Ce choix peut être non seulement biaisé par la méconnaissance de la méthode alternative mais aussi par son coût, l'absence d'harmonisation internationale, ou encore le conservatisme d'une agence réglementaire.

²⁴ T. Hartung, Food for Thought on the Human Whole Blood Pyrogen Test – Lessons Learned in Twenty Years. ALTEX 32(2), 2015

IV- LE CALENDRIER PROSPECTIF DES METHODES EN COURS DE DEVELOPPEMENT

► **Le développement des méthodes alternatives à l'expérimentation animale dépend du type de recherche concerné**

- **La recherche fondamentale** développe des méthodes alternatives consistant à isoler des systèmes – cellulaires ou organotypiques – pour l'analyse de mécanismes plus accessibles que dans un système intégré *in vivo*.
- **La recherche appliquée** développe des méthodes alternatives sur le même principe mais pour l'observation d'un dysfonctionnement du système isolé soumis à des conditions d'exposition représentatives d'une réalité (environnement industriel ou populationnel). Ce volet peut permettre la poursuite du développement de la méthode dans une visée réglementaire. Ceci dit, il s'agit bien ici d'un volet de recherche et développement pour lequel une vérification de l'impact des conditions expérimentales de la méthode sur le résultat est nécessaire. Par exemple, les conditions de culture d'une cellule ou d'un organe influencent elles le résultat final.

► **Ces trois types de recherche utilisent des méthodes similaires mais avec des approches différentes**

- La recherche fondamentale a une approche mécanistique pour laquelle le système isolé est placé dans des conditions qui amplifient le mécanisme considéré afin de mettre en évidence les interactions moléculaires, géniques, protéiques ou cellulaires sous-jacentes.
- La recherche appliquée a une approche observationnelle pour laquelle l'exposition du système isolé est bien contrôlée afin d'observer les dysfonctionnements d'un mécanisme décrit par la recherche fondamentale lors de l'interaction avec des xénobiotiques ou leurs métabolites actifs. Un point important est alors l'extrapolation du dysfonctionnement observé à l'organisme entier.
- La recherche pratique a également une approche observationnelle pour laquelle les dysfonctionnements d'un mécanisme sont associés à une prédiction du type niveau de danger associé à une incertitude calculée, permettant une aide à la décision quant au niveau de protection nécessaire vis-à-vis de l'exposition aux xénobiotiques considérés.

► **Les trois types de recherche sont fortement liés mais avec des critères et des calendriers de développement bien distincts**

- Ainsi la recherche fondamentale est développée en amplifiant un phénomène du système isolé qui n'existe peut-être pas dans l'organisme entier dans son environnement. La recherche fondamentale a également un temps de développement long dépendant de son caractère exploratoire de la molécule au tissu et des moyens technologiques disponibles au temps t.
- La recherche appliquée est mieux connectée avec les attentes de la population puisque supportée par une approche observatoire de l'exposition du système isolé dans des conditions proches d'une réalité. Son temps de développement est plus court car les systèmes utilisés sont souvent finalisés dans le cadre de la recherche fondamentale avec cependant le biais d'avoir un système finalisé par dopage exploratoire.
- La recherche pratique est, quant à elle, basée sur des critères de maîtrise de l'incertitude du résultat obtenu par une approche observatoire d'un système isolé. Son

temps de développement est plus long que la recherche appliquée parce que l'utilisation de système issu de la recherche fondamentale nécessite une calibration importante pouvant conduire même à l'abandon du système trop biaisé par le dopage.

D'autre part, le temps de développement de cette recherche est jugé trop long parce que ses outils doivent servir les directives et réglementations en cours qui ont imposé des délais.

► ***Il semble possible de distinguer 3 temps de développement des méthodes alternatives***

- Le temps de développement de systèmes isolés destinés à la compréhension des mécanismes biologiques et faisant diminuer le nombre d'animaux utilisés pour la recherche fondamentale. Ce temps est long et se compte en dizaine d'années.
- Le temps de développement de systèmes isolés applicables pour la compréhension du dysfonctionnement des mécanismes mis en évidence par la recherche fondamentale dans le cadre d'une exposition maîtrisée et proche d'une réalité. Ce temps est plus court car basé sur les outils de la recherche fondamentale pour autant que leurs critères de développement ne soient pas un biais pour l'application. Ce temps est inférieur à 10 ans.
- Le temps de développement de systèmes isolés capables de prédire un danger et un risque auquel un organisme ou une population est soumis(e) dans des conditions proches d'une réalité pour une aide à la décision. Ce temps peut paraître plus court car basé sur des outils de la recherche fondamentale. Cependant, les besoins de développement pour permettre la maîtrise de l'incertitude associée augmente ce temps à plus de 10 ans pour les systèmes intégrés les plus complexes (cancérogénicité, repro-toxicité, etc.).

Enfin, le temps de développement des systèmes isolés applicables et pratiques doit également être pondéré par le besoin de validation scientifique et réglementaire selon des critères définis qui peut représenter un temps important notamment au niveau réglementaire (cf. paragraphe « les méthodes validées par les instances réglementaires »).

1. CONTRIBUTION AU NIVEAU NATIONAL

Le développement de systèmes isolés dans le cadre de la recherche fondamentale pour l'alternative à l'expérimentation animale s'est fait selon deux angles :

- Financier puisque dédouané des coûts d'accès à une animalerie,
- Scientifique puisque centré sur la compréhension des mécanismes et la prédictivité des outils.

Quel que soit le schéma, ces méthodes sont candidates pour être une méthode alternative. Il est donc important de soutenir le développement de ces systèmes isolés avec une approche exploratoire afin de maintenir un vivier de candidats sans contraintes temporelles.

Actuellement, les meilleurs outils candidats sont d'ores et déjà valorisés dans des « spin offs » et « Start-ups » issus des laboratoires fondamentaux qui développent une recherche appliquée pour la mise à disposition de ces méthodes alternatives. Depuis une dizaine d'années ces sociétés ont su valoriser les outils de la recherche fondamentale et il est fort à parier que les prochaines années verront croître leur nombre. La contribution de la recherche fondamentale nationale au développement des méthodes alternatives est donc primordiale puisqu'elle part de la compréhension des mécanismes jusqu'à leur valorisation en passant par l'amélioration de leur prédictivité.

La recherche pratique est une demande forte au niveau industriel car directement en lien avec le règlement REACH notamment. Cette recherche est clairement multidisciplinaire avec des interactions fortes entre la biologie, la chimie, la toxicologie, l'écotoxicologie, les mathématiques notamment pour le développement de la biologie systémique. Les forces en présence au niveau national sont cependant faibles comme le rapport sur la stratégie nationale de recherche en toxicologie et écotoxicologie²⁵ et le rapport de l'initiative française pour la recherche en environnement santé²⁶ ont pu constater. Ce constat a été fait aussi par le Grenelle de l'Environnement et le Plan National Santé Environnement (PNSE).

On peut estimer le développement d'outils pour des systèmes biologiques simples assez rapide (5 ans) pour ceux basés sur des approches QSAR. Une augmentation des forces en présence permettrait d'avancer dans le même temps sur des systèmes biologiques plus complexes comme la repro-toxicité et notamment dans le cadre d'un rapprochement entre laboratoires fondamentaux et appliqués.

A noter que des actions nationales offrent des opportunités pour soutenir les recherches pour le développement de méthodes alternatives : ANR, Post-Grenelle APR du Programme national de santé environnement et travail (PNREST). En particulier les actions Post-Grenelle du ministère de l'environnement mettent en avant l'augmentation des forces en toxicologie et écotoxicologie et le transfert/valorisation des méthodes vers les industriels. Ces actions sont à renforcer et pérenniser avec un besoin de centralisation et non de dispersion.

2. CONTRIBUTION AUX NIVEAUX EUROPEEN ET INTERNATIONAL

La participation des équipes françaises au développement des méthodes alternatives aux niveaux européen et international reste faible mais toujours de grande qualité. Les « spin offs » et « Start-ups » sont souvent plus actives en s'engageant dans des programmes de recherche partenariale. Ceci s'explique par le fait que les actions européennes et internationales demandent dans la majorité des cas une approche applicative si ce n'est pratique. Les équipes françaises sont prêtes à entrer dans les programmes européens et internationaux. Ainsi, à l'occasion du 7^{ème} congrès mondial sur les alternatives à l'utilisation des animaux en sciences de la vie, la Commission européenne (CE) a lancé un appel à propositions à hauteur de 25 millions d'euros (publication le 30 juillet 2009) et l'industrie cosmétique européenne, représentée par le COLIPA devenue Cosmetics Europe s'est engagée à fournir le même montant.

C'est donc environ 50 millions d'euros qui ont servi à la mise en place de SEURAT-1²⁷

3. STRUCTURATION – VALORISATION DES METHODES ALTERNATIVES

Afin de permettre l'émergence des méthodes alternatives utilisables si ce n'est validées, il apparaît clairement qu'il y a un besoin de fédérer les acteurs des différents types de recherche évoqués ci-dessus. Des actions importantes ont d'ores et déjà été mises en place comme le réseau ANTIOPEs. Ces actions permettent de mettre en relation les besoins des industriels et les outils de la Recherche fondamentale en les combinant pour proposer des stratégies intégrées.

²⁵ Rapport du groupe de travail sur la stratégie nationale de recherche en toxicologie et écotoxicologie (2010), Réf. MESR/DGRI-SSRI A4

²⁶ Feuille de route Transition Ecologique, initiative française pour la recherche en environnement santé (2012)

²⁷ Programme SEURAT (2011-2015) – Towards the Replacement of *in vivo* Repeated Dose Systemic Toxicity Testing – Rapport 2011; www.seurat-1.eu.

V- LES ACTEURS DANS LE DOMAINE DES MÉTHODES ALTERNATIVES, DE LEUR CONCEPTION A LEUR UTILISATION



Plate-forme nationale pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale

La « Plateforme Nationale pour le développement de méthodes alternatives en expérimentation animale », revêt la forme d'un Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS), réunissant des représentants d'institutions (étatiques ou autres), des professionnels et des associations :

- Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche,
- ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de Santé),
- INERIS (Institut National de l'Environnement et des Risques),
- ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail),
- INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale),
- CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique),
- CEA (Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives)
- INRA (Institut National de la Recherche Agronomique)
- UIC (Union des Industries Chimiques),
- FEBEA (Fédération des entreprises de la beauté),
- LEEM (les Entreprises du médicament),
- SIMV (Syndicat de l'industrie du médicament et réactif vétérinaires)
- OPAL (recherche expérimentale et protection de l'animal de laboratoire),
- LFDA (La Fondation Droit Animal, Ethique et Sciences ex Ligue Française des Droits de l'Animal),
- SPTC (Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire).

Cette plateforme, créée en novembre 2007, a pour but de fédérer tous les partenaires, autour de la volonté commune de favoriser la mise en place de méthodes alternatives permettant de réduire ou de supprimer le recours à l'animal de laboratoire notamment dans le développement, l'évaluation et le contrôle des produits de santé et des substances chimiques. La France a rejoint ainsi les pays européens disposant d'une plateforme nationale et réunis au sein de la plateforme européenne ECOPA.



european consensus-platform for alternatives

Le projet ECOPA a été lancé en 2002 par dix pays de l'UE dans le but de faciliter l'échange d'informations scientifiques et de promouvoir la mise au point d'autres méthodes d'expérimentation.

ECOPA coordonne à ce jour les activités de 15 plateformes représentées par la recherche publique, l'industrie, les autorités et les associations de protection des animaux. ECOPA a labellisé un grand nombre de projets européens dédiés au développement de méthodes alternatives (cf. Annexe 3).

1. LES ACTEURS NATIONAUX

A l'échelle de la France, le besoin de nouvelles méthodologies, s'affranchissant au maximum de l'animal, en vue d'évaluer la toxicité et l'écotoxicité des agents auxquels nous sommes exposés, est clairement affiché, notamment dans le cadre du Plan National Santé Environnement 1 (PNSE)²⁸. Ce plan a incité au renfort des « capacités d'évaluation des risques sanitaires des substances chimiques dangereuses » (action 20, action prioritaire), et au développement de « nouveaux outils pour mieux évaluer les risques des substances chimiques et biologiques » (action 21), ainsi qu'au renforcement global de la recherche (avec un axe, axe 6 regroupant 5 actions), notamment par une meilleure coordination, et par un « programme inter-organisme de modélisation et d'expérimentation en toxicologie et épidémiologie ». On notera les recommandations du Comité National d'Evaluation de la Recherche sur la « Recherche sur l'animal et santé de l'Homme » qui viennent renforcer encore ces orientations.

1.1 LE SECTEUR PUBLIC

Les organismes de recherche publique assurent des missions de recherche fondamentale ou translationnelle visant à développer de nouveaux concepts et outils ; ces concepts et outils pouvant déboucher sur des applications dans tous les domaines de la recherche biologique médicale humaine et vétérinaire ainsi que dans le domaine de la production agroalimentaire de la sécurité de l'environnement des personnes et des animaux. Dans ce contexte ils sont les moteurs de l'émergence de nouveaux outils pouvant contribuer à l'enrichissement des méthodes alternatives.

On peut citer plusieurs exemples :

- Le modèle de peau reconstruite de Louis Dubertret²⁹ développé dans le but d'étudier la différenciation cellulaire cutanée. Cette technique a permis, en 1983, les premières greffes de peau humaine complètement reconstituée comprenant un derme et un épiderme équivalents, sur une dizaine d'enfants souffrant de malformations cutanée géantes. Une autre utilisation a été envisagée avec l'application de ce modèle à l'étude de l'action des médicaments, comme modèle d'étude du psoriasis puis comme modèle d'étude de l'irritation pour les produits cosmétiques. D'autres modèles se sont inspirés du modèle de Dubertret pour devenir des modèles alternatifs aujourd'hui réglementaires (irritation/corrosion cutanée : OCDE TG 439).
- Les cultures d'hépatocytes d'origine humaine ou animale développées comme modèle d'étude du fonctionnement hépatique³⁰. Ceux-ci sont devenus depuis des modèles très utilisés par l'industrie pharmaceutique, au stade de recherche et de développement d'un candidat médicament, pour étudier la biotransformation, les inductions/inhibitions enzymatiques potentielles pouvant être à la source d'une perte d'efficacité ou à l'origine d'une toxicité médicamenteuse. La lignée d'hépatocytes Hepa-RG d'origine humaine, nouvellement établie, représente une possible alternative aux hépatocytes humains dont l'obtention est limitée et aléatoire.

²⁸ Le Plan National Santé Environnement vise à répondre aux interrogations des Français sur les conséquences sanitaires à court et moyen terme de l'exposition à certaines pollutions de leur environnement. Pour la première fois dans l'histoire de la santé environnementale en France, l'ensemble de l'expertise publique française dans ce champ a été réuni au sein d'une commission d'orientation pour bâtir un diagnostic de l'état des risques sanitaires liés à l'environnement dans notre pays. www.sante-sports.gouv.fr

²⁹ Laboratoire de dermatologie, Inserm U. 312 : Coulomb, B ; Dubertret, L, Reconstruction cutanée et communications tissulaires, Med Sci (Paris), 1988, Vol. 4, N° 2; p.101-108.

³⁰ André GUILLOUZO (INSERM UMR 991, Université Rennes 1) : Liver Cells and drugs – Colloque INSERM vol 164 Les éditions INSERM.

- De la même manière, les cultures de progéniteurs hématopoïétiques de type monocytaire destinées à l'origine à l'étude de la réponse immune ont été adaptées pour servir de modèle alternatif de prédiction de l'allergie de contact³¹.
- Enfin les gonades de rats fœtaux peuvent être mises en culture (culture organotypique) pendant plusieurs jours pour étudier l'effet sur le développement gonadique, de perturbateurs endocriniens, comme le diéthylstilbestrol et les phtalates ainsi que leurs métabolites³².

La notion d'obligation réglementaire de mettre en œuvre des alternatives en expérimentation animale se fonde dans ce domaine sur les exigences de la Directive 2010/63/UE et de sa transposition en droit français.

³¹ Université Paris Sud INSERM UMR-S 749 / ANSM: N. Ade & al, HMOX1 and NQO1 Genes are upregulated in Response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: role of the Keap1/Nrf2 pathway, (2009) Toxicological Sciences **107 (2)**:451-460.

³² UMR Cellules souches et Radiations, INSERM U 967R. Habert & al, Altération environnementale du développement du testicule fœtal : zoom sur les phtalates.Andrologie (2011) **21** : 24-31.

Divers organismes de recherche publique ou assimilée s'inscrivent dans la mise au point de méthodes alternatives :

▶ **L'INSERM** : l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

L'enquête menée en 2009 par l'INSERM au sein de ses formations de recherche sur le développement et l'utilisation de méthodes alternatives à l'expérimentation animale illustre bien l'effort encouragé par l'institut concernant l'application de stratégies d'optimisation et de réduction.

La plupart des modèles de substitution sont utilisés depuis la création de l'institut et leur mise en place n'a cessé de progresser avec le développement notamment des méthodes *in silico* et *in vitro*, de l'imagerie *in vivo*, de la génomique et des analyses protéomiques qui ont ainsi permis de diminuer le nombre d'animaux utilisés.

Néanmoins, pour les chercheurs de l'INSERM, les méthodes substitutives portent mal leur nom car elles représentent surtout des méthodes originales permettant d'aborder d'autres questions que les méthodes *in vivo*. Elles restent complémentaires aux essais sur l'animal pour lesquels les personnels impliqués s'engagent à limiter les contraintes. Le raffinement des méthodes utilisées constitue une priorité pour l'INSERM qui, dans cette perspective, participe aux investissements en matériel et en personnels des plateformes techniques permettant l'accès à des méthodes non invasives (IRM, PetScan, échographie, etc.).

Bilan et travaux en cours

Les projets s'appuyant sur des études du comportement ont également bénéficié d'un investissement croissant. L'INSERM a joué un rôle moteur dans la formation sur les technologies ouvrant la voie à des méthodes alternatives par la mise en place d'ateliers qui leur ont été entièrement dédiés et s'investit également dans la mise en place de modules de formation interne sur les modèles animaux afin de mieux appréhender leurs limites et faiblesses. L'évolution vers des modèles d'animaux invertébrés (insectes) se confirme ces dernières années et s'inscrit dans une volonté de réduction des contraintes en utilisant des animaux de sensibilité moins développée que les mammifères. L'application de méthodes statistiques a été largement incitée par la mise en place de formations auxquelles participent les chercheurs, bien conscients de la nécessité d'une telle démarche dans une stratégie d'optimisation du nombre d'animaux utilisés. L'INSERM continue à promouvoir le développement de cette stratégie au sein de ses unités de recherche grâce à une interaction forte entre les services impliqués : la formation et le Bureau de l'Expérimentation Animale (BEA), issus des dix mesures Curien destinées à promouvoir l'éthique et les bonnes pratiques en expérimentation animale, qui participent à des actions de communication interne et restent à la disposition des personnels pour les conseiller et les orienter dans le développement de méthodes alternatives et la conception éthique des procédures.

► **Le CNRS et l'INSB** : le Centre National de la Recherche Scientifique et l'Institut National des Sciences Biologiques

Bien qu'aucune équipe ne soit dédiée exclusivement au développement et à la validation des méthodes alternatives, celles-ci sont très largement utilisées depuis la fin des années 1990. Dans la mise en œuvre des projets scientifiques le raffinement est une préoccupation quotidienne des acteurs de l'expérimentation animale. Tout d'abord, il faut noter la prise en considération permanente du bien-être animal qui est cruciale dans le design des projets scientifiques : modalités d'hébergement, enrichissement du milieu, amélioration constante des modalités de chirurgie expérimentale grâce notamment à l'évolution des techniques d'anesthésie et d'analgésie. Toutes ces avancées bénéficient de l'accompagnement du Bureau de l'Expérimentation Animale du CNRS (2 vétérinaires chargés de mission), à travers ses missions de conseil, et de formations.

Bilan et travaux en cours

Depuis 2012, une unité de service est dédiée à l'organisation nationale des formations (réglementaires et continues) en expérimentation animale pour les agents du CNRS (chercheurs, ingénieurs et techniciens).

Une autre avancée majeure du raffinement réside dans le développement et l'utilisation des techniques d'imagerie petit et gros animal au sein de nombreuses plateformes de recherche. Ces techniques non invasives permettent d'obtenir des images anatomiques, métaboliques et fonctionnelles à haute résolution spatiale et temporelle sur le petit et le gros animal. L'imagerie et spectrométrie par résonance magnétique, la tomographie par émission de positons, la tomographie par émission monophotonique, l'imagerie par rayons X, l'imagerie ultrasonore et l'imagerie optique ont pu ainsi se développer grâce au renforcement du nombre d'unités spécialisées au sein de plateformes multidisciplinaires (biologie du développement, physiopathologie, cancérologie, neurologie, virologie...).

Le remplacement est également une préoccupation des acteurs de la recherche au sein du CNRS à travers le développement de techniques comme :

- Les cultures et lignées cellulaires animales et humaines,
- Les tranches de tissus,
- Les organes isolés,
- Les cellules souches animales et humaines,
- La génomique, la protéomique,
- Les méthodes *in silico*.

Il faut également noter le développement important au sein des unités de recherche CNRS de modèles considérés comme moins sensibles que les mammifères, notamment les modèles poissons et amphibiens, mais aussi des modèles invertébrés (*Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, etc.), ce qui constitue un important remplacement relatif.

Enfin la réduction globale du nombre d'animaux utilisés fait partie des axes de sensibilisation développés dans toutes les formations encadrées par le BEA du CNRS.

► **L'INRA** : l'Institut National de la Recherche Agronomique

Même si les chercheurs de l'INRA ont encore peu développé à ce jour des programmes dédiés dans un but premier à la mise au point de méthodes alternatives, plusieurs projets faisant appel à des méthodes que l'on peut assimiler à des méthodes alternatives ont été mentionnés (modélisation, cultures primaires, digesteur, Omics, etc.).

Les chercheurs de l'INRA sont sensibles au développement des méthodes alternatives à l'expérimentation animale dans la construction et l'évaluation notamment éthique de leur projet de recherche ; le nouveau Bureau de l'Expérimentation Animale de l'Institut œuvre dans ce sens. Cependant les chercheurs de l'INRA sont peu impliqués à ce jour dans des programmes réellement dédiés à la mise au point de méthodes permettant la promotion de la démarche dite 3R. Quelques projets ayant cet objectif ont été identifiés :

Bilan et travaux en cours

Une unité de L'INRA est impliquée dans un projet européen qui travaille sur les perturbateurs endocriniens sans avoir recours à l'expérimentation animale (F&F, Food and Fecundity).

Actuellement, plusieurs équipes impliquées en physiologie, génomique, protéomique, toxicologie développent des cultures cellulaires et des techniques *in silico*. Ces équipes sont amenées à comparer des approches conduites *in silico*, à d'autres conduites sur des cellules, des tissus ou des animaux vivants. A titre d'exemple, les cellules contenues dans le lait de mammifères ou les œufs des oiseaux et des poissons sont faciles à obtenir via des méthodes non invasives chez les espèces d'intérêt agronomique et sont donc de plus en plus utilisées. Des recherches sont donc conduites pour développer des modèles alternatifs très prometteurs. Dans ces équipes, tout comme dans les autres Instituts, de nombreux modèles cellulaires sont aussi utilisés (cellules adipeuses, hépatiques, musculaires, mammaires, etc.).

Dans le cadre d'une meilleure estimation des dangers et des risques sanitaires environnementaux des xénobiotiques plusieurs modèles cellulaires sont utilisés.

Deux équipes de l'INRA participent au programme ANTIOPES dédié à la toxicologie prédictive.

► **Le CEA** : le Commissariat à l'Energie Atomique

Le CEA ne développe pas *sensu stricto* de méthodes alternatives à l'expérimentation animale, mais plusieurs programmes de recherche sont susceptibles à terme de permettre le remplacement de l'animal (Méthodes *in vitro* à haut-débit d'étude de la cytotoxicité et de la génotoxicité, criblage cellulaire, analyses transcriptomiques et protéomiques, ingénierie moléculaire des anticorps, etc.) ou un pré screening permettant la réduction du nombre d'animaux. En parallèle, de nouvelles technologies sont développées pour améliorer les conditions de l'expérimentation animale et l'exploitation des données (techniques d'imagerie médicale... cf. paragraphe « les nouvelles approches en expérimentation animale »).

Bilan et travaux en cours

Radiotoxicologie des actinides et des cations mis en œuvre dans le Nucléaire

L'étude de l'impact pulmonaire d'oxydes d'actinides (notamment des nouveaux combustibles "MOX" PuO₂/UO₂) a pour objet de consolider les modèles d'évaluation des risques pour les travailleurs du Nucléaire. L'axe principal porte sur l'étude de la biocinétique des radionucléides et de leur décorporation.

- Cultures de lignées cellulaires humaines ; modèles d'épithélium pulmonaire et rénal, modèle de barrière cutanée, modèle de barrière hémato-encéphalique, lignées osseuses
- Développement de matériaux biomimétiques (os)
- Modélisation des mécanismes d'action des décorporants

Toxicologie des nanoparticules

Les travaux conduits visent à identifier les organes cibles de nanomatériaux préparés au CEA (nanotubes de carbone, graphène, nanodiamants, TiO₂, SiO₂, NanoAg etc.) et à établir les cinétiques de distribution/accumulation dans l'organisme. Les progrès récents de l'imagerie chez le petit animal permettent de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés.

- Modèles cellulaires pour la classification des particules en fonction de paramètres physico-chimiques, modèle de barrière hémato-encéphalique, barrière gastro-intestinale, barrière pulmonaire.
- Toxicologie des perturbateurs endocriniens

Les travaux sont ciblés sur l'organogénèse et l'impact sur la fertilité. Des méthodes originales de cultures organotypiques de gonades (humains et rongeurs) ont été établies.

► **L'INERIS** : L'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques L'INERIS est impliqué depuis une vingtaine d'années dans le développement d'outils essentiels au développement de méthodes alternatives, avec trois axes de recherche et deux actions de coordination :

Bilan et travaux en cours

Le pôle Dangers et impact sur le vivant de l'INERIS développe des activités dans le domaine de la toxicologie et de l'écotoxicologie prédictives en développant des méthodologies de caractérisation des dangers (éco)toxicologiques des substances chimiques basées sur des modèles *in vitro* et *in silico*.

Le pôle s'est en particulier fortement impliqué dans des projets de recherche européens dans le domaine, tels les projets PREDICT-IV et COSMOS centrés sur la prédiction de la toxicité de nouvelles molécules après expositions répétées. Dans le cadre de PREDICT-IV les travaux de l'institut se sont focalisés sur la calibration bayésienne multi-niveau de modèles pharmacocinétiques capables de reconstituer l'exposition subie par les cellules *in vitro* et la calibration bayésienne d'un modèle systémique détaillé de la voie de signalisation nrf2. Dans le cadre du projet COSMOS, des modèles toxicocinétiques et dose-effet ont été développés pour des expositions en dose unique ou répétée sur 4 semaines. A terme, ces modèles pourraient être intégrés à des modèles de cinétique *in vivo* pour prédire la toxicité hépatique humaine *in vivo* à partir de données *in vitro*.

Dans le domaine des méthodes *in silico*, les travaux réalisés dans le cadre du programme européen CALEIDOS ont particulièrement porté sur l'évaluation de l'utilisation des méthodes QSAR et lecture croisée pour l'enregistrement des substances chimiques prévue par le règlement européen REACH et sur la pertinence des prédictions (éco)toxicologiques obtenues par ces méthodes

Dans le domaine de la nanotoxicologie les travaux ont porté sur l'étude de la translocation et de la toxicité de diverses nanoparticules au moyen de modèles de barrières pulmonaires ou hématotesticulaire *in vitro*. Une participation à 2 projets européens (Qualitynano, NanoReg) vise à établir des outils standardisés et des modèles validés pour l'évaluation de la toxicité des nanoparticules par voie respiratoire. Les projets afférents à ces objectifs sont propres à l'INERIS, effectués dans le contexte de l'UMR-I001 Peritox, ou en collaboration avec l'INSERM, le CEA et des universités, dans le contexte de projets financés par l'ANSES, l'ANR ou l'Europe.

Dans le domaine de l'écotoxicologie les travaux ont porté sur le développement de nouveaux modèles cellulaires de poisson basés sur l'expression stable de gènes rapporteurs couplé à un récepteur et/ou un promoteur cible des perturbateurs endocriniens. Pour les approches *in silico* lors du projet MOZAIC un ensemble de modèles pour le poisson zèbre a été développé pour permettre d'évaluer les modifications hormonales dues aux perturbateurs endocriniens, leurs incidences sur les performances des individus et sur la dynamique des populations. Le développement futur de cet outil permettra le transfert à des experts dans un cadre de prédiction d'effets de perturbation endocrinienne.

Enfin, l'INERIS intervient au titre de point de contact national du réseau PARERE (Preliminary Assessment of REGULATORY RElevance) pour la France. Les 3 rôles principaux de ce réseau sont : (i) évaluer, en amont, la pertinence réglementaire des approches alternatives proposées par EURL ECVAM et identifier des approches qui méritent l'attention ; (ii) attirer l'attention sur les domaines critiques/prioritaires et commenter les documents de stratégie de EURL ECVAM ; (iii) commenter les recommandations de EURL ECVAM.

Par ailleurs, l'INERIS est membre du réseau NETVAL, laboratoires sélectionnés pour la validation de méthodes alternatives.

- ▶ **L'INRS** : L'Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles

L'objectif essentiel des programmes de recherche toxicologique de l'INRS consiste à prévenir les atteintes pour la santé qui résultent de l'exposition aux agents chimiques présents sur les lieux de travail. Impliqué dans des activités d'études et de recherche en toxicologie industrielle, le département Toxicologie et Biométrie de l'INRS participe à l'évaluation du risque chimique en milieu professionnel. Il apporte des connaissances mises à disposition de la communauté scientifique et des instances réglementaires, nationales et internationales. Les activités de recherche sont menées dans le département ou en partenariat avec d'autres départements de l'INRS ou encore avec des équipes externes à l'INRS en utilisant des méthodes alternatives ou en contribuant à leur mise au point dans les domaines de la cancérogénèse, de la mutagénèse, de l'immunotoxicité et du passage percutané.

Enfin, l'INRS soumet ses protocoles expérimentaux au Comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale Nancy-Lorraine-Nord-Est (CELMEA). Les travaux des Comités d'éthique s'assurent notamment de la bonne application de la règle des 3R par les expérimentateurs. Elaborée en 1959, cette règle constitue le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en Europe et en Amérique du Nord : « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation, « Raffiner » la méthodologie utilisée ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption de l'expérimentation) et « Remplacer » les modèles animaux.

Le programme détaillé figure en Annexe 2.

1.2 LES AGENCES DE SECURITE SANITAIRE

► L'ANSM : L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

L'ANSM, agence réglementaire en charge de la sécurité des produits de santé participe depuis plus de 20 ans au développement des méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Après la réalisation d'un programme largement dédié aux tests de sécurité des produits cosmétiques, la Direction des contrôles de l'ANSM a concentré son activité sur le domaine du Contrôle qualité des médicaments de nature biologique et plus particulièrement les vaccins.

Bilan et travaux en cours

Le Contrôle Qualité des médicaments biologiques dans le cadre de la libération des lots de vaccins :

Depuis 1994, La Direction des contrôles de l'ANSM participe au Programme de Standardisation Biologique (BSP) mise en œuvre par l'EDQM dont 16 programmes sur 98 ont pour objet de développer des méthodes 3R.

En tant que laboratoire réglementaire français (OMCL) pour le contrôle et la libération des médicaments immunologiques à usage humain, la Direction des contrôles de l'ANSM contribue activement à la stratégie 3R tant sur le plan réglementaire que sur les plans technique et scientifique.

Dans ce cadre, l'ANSM (a été/est) chef de projets pour les études collaboratives de standardisation et des méthodes appliquées au Contrôle Qualité des vaccins et initie également le développement de méthodes de raffinement ou de substitution qui seront ensuite appliquées en routine pour la libération des lots de vaccins (tableau Newsletter n°2 www.francoipa.fr).

En parallèle de cette activité de développement, les laboratoires de contrôles de l'ANSM sont fortement impliqués dans des groupes de travail européens visant à appliquer la Directive 2010/63/UE :

- European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing: groupe de réflexion sur les développements de méthodes pour les vaccins combinés Diphtérie, Tétanos et Pertussis acellulaire et vaccin humain contre la rage
- Pharmacopée Européenne : groupe de rédaction et révision des chapitres et monographies pour les vaccins à usage humain
- Réseau européen des laboratoires de contrôles (OMCL) : Drafting Group Vaccins et Advisory Group pour la rédaction/révision des guidelines des vaccins et guides de libération.

- ▶ **L'ANSES** : L'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

L'ANSES assure des missions de veille, d'expertise, de recherche et de référence sur un large champ couvrant la santé humaine, la santé et le bien-être animal, et la santé végétale. Établissement public à caractère administratif, l'Anses est placée sous la tutelle des ministères chargés de la santé, de l'agriculture, de l'environnement, du travail et de la consommation. Elle a été créée le 1er juillet 2010 par la fusion de deux agences sanitaires françaises : l'Afssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) et l'Afsset (Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail). En reprenant leurs missions et moyens respectifs, l'Anses offre une lecture transversale des questions sanitaires en santé humaine, animale et végétale. Au-delà du rapprochement des moyens et des compétences, cette fusion apporte une véritable valeur ajoutée à l'expertise française. L'Agence appréhende ainsi de manière globale les expositions auxquelles l'Homme peut être soumis à tous les âges et moments de sa vie : travail, domicile, déplacements, loisirs.

Bilan et travaux en cours

Pré-validation du modèle d'hépatocytes humains HepaRG dans les tests de génotoxicité comètes et micronoyau

Etudes de toxicocinétique *in vitro* de la barrière intestinale pour diverses toxines sur modèle (cellulaire CaCo2),

Couplage des tests de génotoxicité comètes et micronoyau et de marqueurs histologiques lors d'études *in vivo* sur rongeurs

Développement de la plateforme « d'imagerie cellulaire à haut contenu informatif »

Développement de méthodes de diagnostic par PCR pour les maladies animales évitant dans de nombreux cas le recours à l'expérimentation animale,

Développement de la plateforme « puces hautes densités »,

Utilisation d'outil de simulation ou de prédiction des étapes cinétiques (approche *in silico*).

Caractérisation des niveaux de pathogénicité de virus, dont les virus influenza.

Mise en évidence d'agents pathogènes chez les poissons en développant des lignées cellulaires spécifiques au poisson.

Etude la maladie de Parkinson sur lignées murines.

D'autre part, l'Anses dispose également de la programmation et du soutien à la recherche dans le cadre de ses missions. Cela se concrétise notamment par la conduite du programme national de recherche Environnement-Santé-Travail (PNREST), outil essentiel pour développer les connaissances en appui aux politiques et aux travaux d'évaluation des risques sanitaires.

Chaque année, l'Anses lance un appel à projets de recherche sur des thématiques spécifiques, dont celle incluant les projets utilisant ou développant des méthodes *in vitro* ou autres alternatives à l'utilisation des animaux.

Pour en savoir plus : annexe 3

1.3 LES SOCIÉTÉS SAVANTES

► **La SPTC** : Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire créée en 1987

L'association a pour souci la réduction de l'usage de l'animal de laboratoire. Elle a pour but :

- De promouvoir tout modèle *in vitro* et *in silico* pouvant être utilisé en pharmacologie et en toxicologie,
- De développer des cultures cellulaires ou toutes autres structures sub-cellulaires ou moléculaires permettant d'étudier la pharmacologie, la toxicologie ainsi que les modèles informatiques et le fonctionnement habituel normal ou anormal de ces cellules,
- De faciliter les échanges d'informations et les relations entre toutes les personnes, les groupements et les services publics ou privés concernés par cette action,
- De diffuser des informations et des explications techniques et scientifiques auprès des médias et du public,
- D'organiser des groupes de travail ou de réflexion, des congrès, séminaires ou colloques,
- De faciliter la formation de jeunes chercheurs,
- De soutenir d'une façon générale toute initiative tendant à des fins similaires.

Elle organise tous les ans un colloque qui présente dans un domaine donné les derniers développements de la recherche en pharmacologie et toxicologie cellulaire. Elle associe toujours les chercheurs du monde académique et du monde industriel.

Elle a joué un rôle très actif dans la mise en place de FRANCOPA.

1.4 LES ASSOCIATIONS DE PROFESSIONNELS

Plusieurs associations rassemblent des professionnels pour l'expérimentation animale, dans des buts de communication et de réflexion sur les pratiques de l'expérimentation animale par l'organisation de colloques. Ne sont reprises ici que les associations ou organisations qui promeuvent le développement de méthodes alternatives en expérimentation animale dans un contexte scientifique.

► **L'AFSTAL** : L'Association Française des Sciences et Techniques de l'Animal de Laboratoire

L'AFSTAL a été fondée en 1972 et représente les différents professionnels de la recherche biomédicale qui contribuent aux progrès de la médecine et à l'amélioration de la santé de l'Homme et des animaux, grâce à l'étude de modèles animaux. L'AFSTAL s'adresse aux techniciens, zootechniciens, étudiants, chercheurs, ingénieurs, vétérinaires et autres personnels scientifiques, techniques, tout en interagissant avec les ministères directement chargés de l'expérimentation animale (MESR et MAAP). Elle aide ses adhérents à améliorer leurs pratiques quotidiennes pour s'assurer que leurs travaux sont mis en œuvre de façon à produire des résultats du meilleur niveau de qualité, tout en garantissant le respect et le bien-être des animaux. L'AFSTAL compte actuellement plus de 500 adhérents et a pour mission :

- De promouvoir les échanges et la diffusion des connaissances scientifiques et techniques actuelles liées à l'animal de laboratoire,
- De favoriser la formation des professionnels de l'animal de laboratoire aux Bonnes Pratiques Animales, c'est-à-dire aux principes et aux méthodes qui respectent en particulier le concept des 3R.

▶ **Le GIRCOR** : Groupe Interprofessionnel de Réflexion et de COmmunication sur la Recherche

Association regroupant les principaux acteurs de la recherche biomédicale publique (CEA, CNRS, INRA, INSERM, Institut Pasteur, Université) et de l'industrie du médicament et de la sécurité. Le GIRCOR a une mission de réflexion et de communication sur l'expérimentation animale. A ce titre il a initié dès 1988 à travers le GRICE (Groupement de Réflexion sur les Comités d'éthique) la mise en place de Comités d'éthique dans les établissements de recherche industrielle. Le GRICE a rédigé un guide pour l'aide à l'évaluation éthique des protocoles qui sert maintenant aux nouveaux Comités adhérant aux principes de la Charte nationale. La création d'une formation des membres évaluateurs des Comités d'éthique (en collaboration avec les 4 écoles vétérinaires françaises et les services de formation permanente de certaines universités) contribue également à la promotion de la démarche éthique en expérimentation animale. A ce titre le GIRCOR, émanation de la communauté scientifique, a devancé le législateur. Plus récemment le GIRCOR a participé à l'édition de la Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale rédigée par le Comité national de réflexion éthique en expérimentation animale (CNREEA, voir paragraphe 7) et accompagne le MESR dans la promotion active de cette Charte nationale.

▶ **OPAL** : Recherche expérimentale et protection de l'animal de laboratoire

Depuis plus de 40 ans, l'OPAL réunit des scientifiques (recherche académique et recherche privée) et des industriels. Elle s'est donné pour missions de promouvoir et de soutenir toutes actions en faveur du respect dû aux animaux de laboratoire visant à :

- Contribuer au développement et à la validation de méthodes alternatives fiables permettant de limiter le recours à l'animal de laboratoire,
- Respecter et améliorer les conditions d'hébergement, d'élevage et d'utilisation d'animaux de laboratoire,
- Améliorer les règles de bonnes pratiques d'expérimentation animale.

Parmi les actions menées par l'OPAL, on peut citer :

- L'organisation de colloques scientifiques en relation avec la règle des 3R,
- L'attribution de prix : Prix Amalthée et Prix de Thèse qui récompensent des travaux de recherche dans le domaine des méthodes alternatives ou complémentaires à l'expérimentation animale ou améliorant les conditions d'expérimentation ou d'environnement des animaux de laboratoire.

Bilan et travaux en cours : Activités de l'OPAL 2012-2014

PRIX OPAL d'Or

L'OPAL d'OR, créé en 1993, est destiné à récompenser un journaliste de la presse écrite, de la radio ou de la télévision pour la sincérité et l'objectivité de son information dans le domaine de l'expérimentation animale.

4 avril 2012

Monsieur Pierre-François GAUDRY pour le film qu'il a produit et réalisé « Bye bye cobaye » qui a été diffusé à 2 reprises en 2011 sur France 5. Ce film présente de manière objective la réalité de l'expérimentation animale et les développements en cours de méthodes alternatives

Prix de Thèse OPAL

Le Prix de thèse OPAL a été créé afin de récompenser des travaux de thèses originaux de doctorat d'université ou de niveau équivalent, ayant pour thèmes soit la recherche de méthodes substitutives permettant de limiter le recours à l'animal de laboratoire, soit la mise au point de techniques améliorant la qualité de vie des animaux utilisés. Ce Prix est décerné par l'Académie nationale de Pharmacie.

17 décembre 2014

Madame Lætitia Jaillardon, pour son travail intitulé : « Identification et validation du carcinome mammaire spontané canin comme modèle des interactions entre régulateurs de croissance, obésité et cancer du sein. »

18 décembre 2013

Monsieur Samir Dekali, pour son travail intitulé : « Développement de modèles *in vitro* de la barrière alvéolo-capillaire pour l'étude de la toxicité et du passage des nanoparticules. »

19 décembre 2012

Monsieur Charles PERSOZ, pour son travail intitulé : « Air intérieur et santé respiratoire, approche épidémiologique et expérimentale. »

Colloques

Le 4 avril 2012 - « Le 4e R selon l'OPAL : la responsabilité des acteurs de l'expérimentation animale » sous la présidence de Bernard Andrieux. Maison de la Chimie, Paris.

1.5 LES ORGANISATIONS DE PROTECTION ANIMALE

Les organisations de protection animale sont représentées au sein de la CNEA-Commission nationale de protection animale, du CNREEA-Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale, et de la plateforme française sur les méthodes alternatives en expérimentation animale. A l'égard de l'expérimentation animale, elles se classent en deux courants principaux. L'un rassemble la majorité de ces organisations (dont les Fondations Brigitte Bardot et 30 Millions d'amis, les associations SPA, One voice), qui sont engagées dans la protection de l'animal sur l'ensemble du domaine sociétal, et pas seulement sur l'expérimentation. Vis-à-vis de cette dernière, il existe des positions variées et parfois décalées, confondant fréquemment expérimentation et vivisection et considérant souvent de façon extrémiste l'expérimentation sur l'animal comme non fiable voire nocive parce que non transposable à l'Homme, et inutile parce que déjà totalement remplaçable par des méthodes substitutives. L'autre courant est plongé dans la pratique scientifique au quotidien.

- ▶ **LFDA** : La Fondation Droit Animal, Ethique et Sciences (ex Ligue Française des Droits de l'Animal)

La Fondation LFDA reconnue d'utilité publique, qui est l'un des membres fondateurs de la Plateforme nationale est la représentante du deuxième courant. Depuis plus de trente-cinq ans, cette organisation se voue au droit animal, à l'éthique et aux sciences ; elle avance des arguments scientifiques raisonnés à l'égard de l'expérimentation animale, et agit en faveur d'une formation juridique et éthique des expérimentateurs, ainsi que du développement des méthodes alternatives, par la voie de colloques, conférences, et publications à caractère scientifique, éthique et juridique. La Fondation LFDA a créé en 1984 le Prix de biologie Alfred Kastler, qui récompense des chercheurs ayant consacré leurs travaux à ces méthodes. Dans ce courant se situe également l'association OPAL.

Bilan et travaux en cours : Activités de 2011 à 2015 :

Depuis la rédaction du présent Rapport, la Fondation Droit Animal, Ethique et Sciences, partenaire de FRANCOOPA, a continué de participer activement, elle-même comme au travers de plusieurs de ses membres, aux travaux et aux réunions des instances vouées en France à l'amélioration des conditions d'utilisation de l'animal à des fins scientifiques : CNEA, CNREEA, FRANCOOPA.

Parallèlement, la Fondation LFDA a conduit ses propres actions.

En 2011, la Fondation LFDA a remis son 8^e Prix de biologie Alfred Kastler, créé afin d'encourager la recherche et l'application de méthodes évitant l'utilisation expérimentale traumatisante de l'animal. Le Prix 2011 a couronné une méthode de culture *in vitro* de cellules cancéreuses colorectales humaines en alternative aux xénogreffes de tumeur humaine sur l'animal (Virginie Dangles-Marie).

En 2012, lors du Colloque international organisé par la Fondation LFDA « La souffrance animale, de la science au droit », quinze des vingt-quatre communications ont impliqué ou concerné l'expérimentation sur l'animal et sa préservation, notamment au sujet des amphibiens, des céphalopodes, des poissons, de la réglementation européenne, ou de l'éthique face à l'expérimentation douloureuse.

En 2013, le 9^e Prix de biologie Alfred Kastler a distingué une Formation réglementaire en technique chirurgicale appliquée à l'expérimentation sans utilisation d'animal vivant (Catherine VOGT).

En 2014, le Prix de Droit nouvellement créé pour récompenser et stimuler les initiatives en faveur du droit animal, a été décerné à un enseignement du droit applicable à l'expérimentation animale dispensé à l'université de Caen (Aloïse Quesne).

L'année 2015 verra l'attribution du 10^e Prix de biologie, ainsi que le déroulement d'un important colloque « Le bien-être animal, de la science au droit ».

Le Prix de biologie Alfred Kastler et le Prix de Droit, respectivement de 4 000 € et de 3000€, sont exclusivement financés par les dons de particuliers.

1.6 L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

Dans l'enseignement supérieur scientifique et technique, la Directive 2010/63/UE laisse la possibilité d'utiliser des animaux vertébrés vivants mais uniquement s'il n'existe pas de méthode alternative ou si elle constitue une nécessité pédagogique.

Dans les filières scientifiques généralistes (licences, formation commune de base des études pharmaceutiques, etc.) il apparaît que le nombre d'animaux utilisés a subi ces dernières années une diminution notable. Cette baisse est liée en partie à l'utilisation d'outils comme les films pédagogiques, les logiciels de simulation sur ordinateur ou encore l'emploi de mannequins, d'organes isolés ou de cultures cellulaires. La grande majorité des enseignants souhaite utiliser ces outils ou en généraliser l'usage.

Les formations à finalité professionnelle ou professionnalisante comme les BTS, DUT, Licence professionnelle, école vétérinaire, Université technologique, école d'Ingénieur, spécialisations pharmaceutiques doivent intégrer dans leur cursus à la fois des connaissances théoriques et des compétences pratiques. Cependant, même dans ces formations, les méthodes alternatives ont toute leur place.

Pour ceux qui se destinent aux métiers de l'expérimentation animale, ces connaissances et compétences doivent répondre aux critères exigés dans les textes réglementaires (cf. Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, élèves et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques). Leur formation obligatoire comprend notamment la réglementation française dont les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement et un enseignement sur les méthodes alternatives.

Les travaux pratiques sur animaux vivants doivent maintenant faire l'objet d'une autorisation préalable du ministère de la recherche après avis du comité d'éthique en expérimentation animale dont dépend l'établissement utilisateur. Les membres de ces comités doivent donc être compétents pour veiller à ce que soit respectée l'obligation d'utiliser des méthodes alternatives si elles sont disponibles. Ceci met donc l'accent sur leur formation et l'actualisation de leurs connaissances. Un organisme comme le GIRCOR (Groupement Interprofessionnel de Réflexion et de COmmunication sur la Recherche) propose, par exemple, des stages de formation pour les membres de ces comités.

Rappelons enfin que le Décret 2013-118 prévoit que la Commission nationale de l'expérimentation animale donne un avis sur l'approbation de ces formations réglementaires. Mais elle peut également être consultée, donner des avis et faire toute proposition qu'elle juge utile sur la mise au point, la validation et la promotion des approches alternatives susceptibles de fournir le même niveau ou un niveau plus élevé d'information que les procédures expérimentales utilisant des animaux, mais sans impliquer l'utilisation d'animaux ou en réduisant le nombre d'animaux utilisés ou en recourant à des procédures expérimentales moins douloureuses.

1.7 LES COMMISSIONS EN CHARGE DE L'EXPERIMENTATION ANIMALE ET LES COMITES D'ETHIQUE

► CNEA : La Commission Nationale de l'Expérimentation Animale

Cette Commission a été instituée auprès des ministres chargés de la recherche et de l'agriculture, en application du décret N°87-848 du 19 octobre 1987 relatif aux expériences pratiquées sur les animaux vertébrés (codifié ultérieurement dans les articles R. 214-116 et suivants du Code Rural). Elle regroupe des représentants de l'Etat, des représentants des milieux professionnels publics et privés et des personnes désignées sur proposition

d'organisations reconnues d'utilité publique de protection des animaux et de protection de la faune sauvages. Elle a pour mission (article R214-116 du Code rural) de donner un avis sur tout projet de modification de la législation ou de la réglementation relative à l'expérimentation animale et elle peut également être consultée par les ministres chargés de la recherche et de l'agriculture auprès desquelles elle est instituée pour donner des avis et faire toute proposition qu'elle juge utile sur différents items et en particulier la mise en place de méthodes expérimentales permettant d'éviter l'utilisation d'animaux vivants.

Activités en lien avec la Commission Nationale de l'Expérimentation Animale (CNEA)

La transposition dans le droit français de la directive 2010-63 a été réalisée sous l'égide du ministère de l'agriculture après avis de la Commission Nationale de l'Expérimentation Animale (CNEA) qui avait constitué un groupe de travail dont l'objectif a été de respecter l'esprit de la directive qui protège l'animal tout en évitant aux expérimentateurs des contraintes trop importantes.

La directive 2010-63 donne également des indications précises quant à la formation initiale, complémentaire spécifique et continue des différents acteurs de l'expérimentation animale : concepteurs de projets, praticiens et soigneurs. La CNEA a donc constitué aussi un groupe de travail chargé de définir le contenu et le volume horaire des formations spécifiques que devront suivre ces différents acteurs. A la fin de l'année 2013, les propositions de ce groupe ont été concrétisées sous la forme d'un formulaire Cerfa établi par le Ministère de l'agriculture.

En ce qui concerne les projets de recherche impliquant l'animal de laboratoire, la directive 2010-63 impose désormais que ces projets aient été soumis à une évaluation éthique et qu'ils soient préalablement autorisés par les autorités compétentes. Cette évaluation des projets est réalisée par des comités d'éthique en expérimentation animale.

▶ **CNREEA** : Le Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale

Ce Comité a été créé en 2005 par les ministres chargés de la recherche et de l'agriculture sur proposition de la Commission nationale de l'expérimentation animale (CNEA). Le Comité national tire sa légitimité à la fois du décret fondateur et de sa composition : il est en effet constitué de représentants de la société civile (philosophes, sociologues, juristes), de la protection animale, de représentants des professionnels de l'expérimentation animale, privés et publics, et de l'Etat. Il a pour mission d'émettre des avis sur les questions éthiques soulevées par l'expérimentation animale et d'harmoniser les principes et fonctionnements des différents Comités d'éthique. L'une de ses premières actions a été d'élaborer la Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale permettant une harmonisation de l'éthique en matière d'expérimentation animale dans notre pays. Elle a été publiée en 2008 et est disponible sur : <http://www.enseignementsuprecherche.gouv.fr/cid28541/la-charte-nationale-portant-sur-l-ethique-de-l-exp-erimentation-animale.html>.

▶ **Les Comités d'Ethique**

Les Comités d'éthique en expérimentation animale sont des instances consultatives dont la mission est de donner des avis sur les projets qui leur sont présentés promouvant ainsi l'ensemble des principes et pratiques éthiques en expérimentation animale. Ils ont d'ores et déjà rédigé au sein du GRICE (voir point 4 ci-dessus) le Guide de l'évaluation éthique des études sur animaux, paru en janvier 2009, et qui a reçu l'approbation des ministères chargés de la recherche et de l'agriculture mais aussi la recommandation du CNREEA. Les Comités d'éthique se réorganisent dans notre pays pour mettre en application la Charte nationale.

1.8 LE SECTEUR INDUSTRIEL

Il convient de souligner d'emblée que la plupart des démarches industrielles en termes de développement de méthodes alternatives en expérimentation animale s'inscrivent dans une échelle européenne voire internationale.

Les industries développent ou améliorent en permanence des tests alternatifs à l'expérimentation animale afin de perfectionner leurs processus de screening ou de mieux appréhender les mécanismes d'actions de leurs molécules d'intérêt. Dans le cadre de la sélection de substances chimiques actives, les tests sont parfois miniaturisés pour être implantés sur des plateformes à haut débit (robots).

Certaines sociétés françaises de prestation de service se sont spécialisées dans les méthodes alternatives et proposent des catalogues au niveau international. D'autres, à l'origine ne présentant que des expérimentations animales, ont ouvert des services spécifiquement consacrés aux tests alternatifs.

► DANS LE DOMAINE DE LA CHIMIE

UIC (Union des industries chimiques)

L'UIC promeut les méthodes alternatives dans le cadre de sa participation à FRANCOPA pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale ».

L'un de ses syndicats sectoriels, l'ASPA (Agents de surface et produits auxiliaires) et sa section INGRECOS (Ingrédients cosmétiques), soutient le développement des méthodes alternatives notamment en participant financièrement à divers travaux (ERASM, HERA, etc.) par le biais des fédérations européennes auxquelles ce syndicat est rattaché (EFfCI et CESIO).

La réglementation REACH (voir paragraphe II.2) impose aux industriels d'enregistrer toute substance produite ou importée en Europe à plus d'une tonne par an, en fournissant un set de données toxicologiques et écotoxicologiques dont la nature est variable selon le tonnage et la dangerosité de la substance. Cette réglementation prévoit l'obligation de partager les données, afin de réduire au maximum les tests sur vertébrés. De plus, l'ECHA (Agence européenne des produits chimiques) lance régulièrement des consultations publiques sur les méthodes d'essai proposées par les industriels (« testing proposal ») faisant intervenir des animaux vertébrés, afin de s'assurer que les données sont fiables et adéquates et pour éviter les essais inutiles sur les animaux. Les QSAR, qui sont des méthodes *in silico* faisant intervenir des modèles de la relation structure-activité, permettent dans certains cas d'obtenir des informations suffisantes pour éviter aux industriels de réaliser des tests sur animaux dans le cadre de REACH.

BASF constitue un exemple d'engagement de l'industrie dans le développement et l'utilisation de méthodes alternatives en respectant la règle des 3R. Un site internet est d'ailleurs exclusivement dédié à cette thématique. Cette entreprise développe des méthodes sans animaux dans son propre laboratoire scientifique depuis 2004, et se focalise particulièrement sur les méthodes *in vitro*. Une douzaine de nouvelles méthodes alternatives environ sont actuellement en phase de développement. Les recherches se concertent non seulement sur les nouvelles problématiques toxicologiques, mais aussi sur les procédures pour les problématiques existantes afin d'améliorer les informations obtenues. L'objectif est de remplacer toujours plus de méthodes faisant intervenir des animaux, et en combinant les méthodes existantes, d'obtenir une information pertinente sur la toxicologie des substances.

Des méthodes alternatives sont déjà utilisées en routine dans le laboratoire de BASF depuis octobre 2009, et à ce jour, 25 méthodes alternatives sont en place. Un tiers environ des études toxicologiques réalisées par BASF font appel à une méthode de remplacement. Ces méthodes sont d'ailleurs utilisées systématiquement pour les tests de screening sur les substances en développement, ce qui permet d'améliorer les connaissances toxicologiques sur la substance, de mieux comprendre les mécanismes d'action, et de planifier les tests réglementaires de manière plus efficace. Une plaquette³³ sur les méthodes alternatives utilisées par BASF est disponible sur ce site.

Concernant les aspects réglementaires n'autorisant pas les études toxicologiques *in vitro*, les tests sont réalisés avec le moins d'animaux possibles tout en cherchant à obtenir le maximum d'informations. Une méthode animale est remplacée dès qu'une méthode alternative disponible est compatible avec un test OCDE, et qu'elle est reconnue par les autorités.

De plus cette entreprise est impliquée dans la formation de toxicologues, ainsi que dans des programmes de recherche universitaires. Bien que la reconnaissance d'une méthode alternative par les autorités puisse prendre plusieurs années, BASF est également active dans le dialogue avec les institutions dans ce but. Dans ce cadre, BASF fournit aux autorités toutes les informations nécessaires sur la substance, et coopère dans les comités d'experts.

En 2013, dans le cadre de ses travaux concernant des méthodes sans animaux pour tester la sensibilisation, et l'irritation oculaire et cutanée, BASF a reçu le Prix de la Recherche sur la protection des animaux, décerné par le Ministère allemand de l'alimentation, de l'agriculture et de la protection des consommateurs.

► DANS LE DOMAINE COSMETIQUE

FEBEA (Fédération des Entreprises de la BEAuté)

La FEBEA promeut les méthodes alternatives auprès de ses adhérents mais aussi dans d'autres secteurs industriels par sa contribution à l'OPAL et à Francopa en participant au niveau européen aux groupes de travail et à l'effort financier de Cosmetics Europe.

Le Règlement cosmétique organise une quadruple interdiction en ce qui concerne l'expérimentation animale pour les tests de sécurité afin de répondre aux exigences du règlement :

- Interdiction de mise sur le marché de produits finis ayant été testés sur les animaux ;
- Interdiction de mise sur le marché de produits cosmétiques dont les ingrédients ont été testés sur les animaux ;
- Interdiction de réalisation, sur le territoire de l'Union européenne, d'expérimentation animale sur les produits cosmétiques finis ;
- Interdiction de réalisation, sur le territoire de l'Union européenne, d'expérimentation animale sur des ingrédients ou des combinaisons d'ingrédients.

Les dates d'entrée en application de ces différentes interdictions se sont échelonnées jusqu'au 11 mars 2013 ; actuellement toutes les interdictions s'appliquent totalement. Les méthodes alternatives existantes sont donc utilisées en routine par les industriels.

33

http://www.alternative-methods.basf.com/group/corporate/alternatives/en/function/conversions:/publishdownload/content/microsites/alternatives/images/Flyer_AlternativeMethods.pdf

<http://www.alternative-methods.basf.com/group/corporate/alternatives/en/microsites/alternatives/index>

Mais c'est bien avant 2013 que l'industrie cosmétique s'est engagée, à l'échelle européenne et internationale, dans le développement des méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Depuis plus de 20 ans l'industrie, par l'intermédiaire de l'association européenne Cosmetics Europe, a dédié ses scientifiques les plus compétents et plus de 40 millions d'euros au développement mais aussi à la validation scientifique et à l'adoption réglementaire de nouvelles méthodes de substitution pour l'évaluation des effets sur la santé humaine dans le contexte de l'évaluation de la sécurité des produits.

- 1992 : création du SCAAT (*Steering committee for Alternative to Animal Testing*) afin de coordonner les efforts de l'industrie cosmétique.
- 2005 : co-fondation de l'EPAA (*European Partnership for Alternative Approaches to animal testing*)
- 2011 : participation au programme SEURAT dédié à la recherche de méthodes substitutives pour évaluer les effets toxiques complexes (<http://www.seurat-1.eu>), initiative unique co-financée par la Commission européenne et l'industrie cosmétique.

Les résultats sont majeurs :

- Validation de onze méthodes pour quatre critères toxicologiques utilisables dans tous les secteurs industriels
- Méthode *in vitro* pour le passage transcutané
- Validation de tests *in vitro* pour l'irritation oculaire
- Pré-validation de méthodes pour la sensibilisation cutanée
- Environ 200 publications scientifiques depuis 2007

La recherche en cours : un programme, dirigé par Cosmetics Europe, se concentre sur 5 domaines de recherche.

1. **L'irritation oculaire** : un groupe de travail se concentre sur l'identification par des méthodes *in vitro* des paramètres du processus de lésion et de guérison les plus prédictifs des réactions chez l'Homme. Les activités du groupe ont permis l'adoption par l'OCDE de la ligne directrice n°492 et un élargissement du domaine d'application des méthodes d'étude de l'irritation oculaire, de l'irritation cutanée et de la corrosion cutanée à des substances classées irritantes ou corrosives.
2. **La génotoxicité/mutagénicité** : le but du groupe de travail est d'améliorer la spécificité des tests *in vitro* de génotoxicité et de développer de nouveaux tests *in vitro* plus prédictifs et pertinents pour l'exposition par voie cutanée. Le travail actuel porte sur un test de génotoxicité *in vitro* combinant les modèles de peau reconstruites 3D et les tests du micronoyau et des comètes.
3. **La sensibilisation cutanée** : il s'agit tout d'abord de mieux comprendre les interactions entre les substances chimiques et la peau, et l'activation du système immunitaire, à l'origine des allergies cutanées. Le but est de développer des tests *in vitro* capables de mesurer les différents paramètres chimiques et biologiques responsables de l'induction de la sensibilisation cutanée. Plusieurs méthodes *in vitro* ont été développées par Cosmetics Europe, il s'agit maintenant d'élaborer une stratégie de tests intégrée permettant de prédire le potentiel sensibilisant des substances.
4. **La biodisponibilité cutanée et le métabolisme** : afin d'améliorer la prédiction et la mesure de la biodisponibilité par voie cutanée à l'aide de méthodes *in vitro* et *in silico*.
5. **La toxicité systémique** : il s'agit principalement des activités de recherche dans le cadre du programme SEURAT-1. Cette collaboration, sous l'égide de la Commission européenne, a pour objectif de revoir fondamentalement le processus d'évaluation de la sécurité des substances chimiques. Les études de cas devraient permettre de vérifier le concept consistant à utiliser de nouvelles méthodes *in vitro* et *in silico*, des stratégies

intégrées et le principe d'"*adverse outcome pathway*" pour l'évaluation de la sécurité des cosmétiques

L'avenir : l'industrie cosmétique a établi un programme de recherche 2016-2020 notamment pour le remplacement complet des méthodes animales pour les critères toxicologiques complexes nécessitant encore des recherches fondamentales.

► DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE

LEEM (les entreprises du médicament)

Les entreprises du médicament représentées par le LEEM réalisent près de 99 % de l'activité du médicament en France. Leur mission est de créer et de développer des médicaments et vaccins nouveaux à usage humain pour l'ensemble des maladies. Le rôle du LEEM consiste à élaborer et à faire respecter l'éthique de la profession, à faciliter les échanges entre ses membres, à défendre leurs intérêts et à resserrer les liens avec les autres professions de santé. Dans ce cadre, les entreprises du médicament contribuent à la recherche et au développement de méthodes alternatives et ont mis en place très précocement le principe des 3R dans leur processus de recherche et de développement de nouveaux médicaments et vaccins.

Les industriels du médicament sont en constante recherche de nouvelles thérapeutiques. Ils doivent en permanence faire concilier leurs efforts de recherche et les impératifs du bien-être animal. Pour cela, les industriels utilisent et développent de nouvelles approches 3R.

Par exemple, en 2011, grâce à l'expertise de l'industrie pharmaceutique et aux données apportées, des guidelines ICH (International Conference Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for Human Use) ont pu être révisées, conduisant à une rationalisation et une optimisation de certains tests de sécurité, d'immunotoxicité et d'évaluation de médicaments anticancéreux, permettant ainsi une diminution de près de 50% du nombre d'animaux nécessaires aux tests de sécurité réglementaire.

Plusieurs projets IMI (Innovative Medicines Initiative), partenariats de recherche entre le secteur public et le secteur privé, sont en cours pour développer des approches 3R. Par exemple :

- StemBANCC pour développer des lignées cellulaires permettant d'améliorer et d'accélérer le développement de nouvelles molécules, réduisant ainsi le besoin de tests de toxicité sur animaux
- OrBITO pour créer un nouveau modèle de laboratoire non animal et des tests informatiques afin d'évaluer la distribution d'une molécule dans l'organisme

De nombreux autres exemples récents peuvent également être cités :

- Screening *in silico* ADME pour s'assurer que seules les molécules ayant le profil métabolique le plus favorable soient testées chez l'animal,
- Screening sur poissons zèbres pour les tests de sécurité gastro-intestinale et reproduction,
- Tests sur cellules isolées, sur tissus, etc.
- Efficacité de nouveaux vaccins via le développement de test *in vitro* sur sérum,
- Développement et validation d'un test ELISA permettant de remplacer un test d'efficacité sur animaux d'un vaccin hépatite B. Ce développement a été récompensé par un trophée RSE du LEEM en 2015.

De nombreux autres exemples peuvent être trouvés dans les rapports RSE des entreprises du médicament.

De plus, des synthèses régulières des actions des entreprises du médicament en faveur du bien-être animal et du développement des 3R sont également présentées sur le site de la Fédération Européenne (EFPIA) : www.efpia.eu/topics/innovation/animal-welfare

► DANS LE DOMAINE VETERINAIRE

SIMV (Syndicat de l'industrie du médicament et réactif vétérinaires)

En tant que représentant des fabricants et des entreprises responsables de la mise sur le marché français des médicaments et réactifs destinés aux animaux de compagnie et d'élevage, le syndicat de l'industrie du médicament et réactif vétérinaires est l'ADN commun à l'ensemble de ces industries, au cœur de nombreuses interactions. Le SIMV compte 37 adhérents.

Avec 833 millions d'euros de chiffre d'affaires en France en 2015 et 1,2 milliard d'euros à l'exportation dont 700 millions pour la seule Union Européenne, plus de 6 600 salariés et le plus grand arsenal thérapeutique (2 700 AMM), la France est le premier pays en matière de recherche et de fabrication de médicaments et de produits de diagnostic vétérinaire en Europe. Cet atout est renforcé par la présence de 4 entreprises françaises dans les 10 premiers laboratoires mondiaux. L'attractivité globale de la France pour les questions de santé animale tient à la densité de ce maillage industriel, à la place centrale de l'élevage, aux expertises scientifiques et techniques reconnues et à la capacité des industriels à s'investir dans la gestion de projets R&D en réseaux et projets internationaux.

Ayant pour ambition de contribuer à favoriser les innovations de demain, le SIMV est membre de réseaux en santé tels que le Réseau Français pour la Santé Animale (RFSA), groupe miroir de la plateforme européenne (ETPGAH), Hippolia (fondation française consacrée à la recherche équine), l'ICSA (Institut Carnot Santé Animale) ainsi que d'Ariis (Alliance pour la Recherche et l'Innovation des Industries de Santé).

En 2014, le SIMV a entrepris la création d'un événement européen dédié à la recherche et l'innovation, les premières rencontres de recherche en Santé Animale (R&D Dating for Animal Health and Innovation) qui ont eu lieu les 2 et 3 décembre 2014 à Lille, hébergées au sein de BioFIT. 41 entreprises et 37 équipes de recherche ont participé à ce rendez-vous.

Différents sites internet³⁴ reprennent les actualités du secteur de la santé animale.

Les industriels de la santé animale accordent une importance particulière au bien-être animal, auquel leur activité est par essence dédiée, par la mise à dispositions de médicaments destinés aux animaux et de produits de diagnostic de leurs maladies. La mise en œuvre des principes des 3R est donc une constante préoccupation en R&D et en contrôle qualité. Ainsi l'industrie participe aux travaux destinés au développement d'alternatives, comme par exemple ceux que les possibilités de suppression dans certaines conditions des tests d'innocuité à la libération des vaccins vétérinaires, le remplacement des épreuves sur rongeurs pour les tests de « potency » à libération de certains vaccins vétérinaires par des tests sérologiques voire *in vitro*, etc. les données apportées par les industriels, que ce soit dans la collaboration avec les agences réglementaires, l'EDQM ou VICH, occupent une place centrale dans ce processus. Enfin, le SIMV a joué un rôle moteur dans l'initiation du projet européen « Requirements for the autorisation of vaccines in the EU »

³⁴ Un site institutionnel (www.simv.org).

Un site internet grand public sur le médicament vétérinaire lemedicamentveterinaire.simv.org

Un site d'information sur les rencontres de recherche en santé animale rdd.simv.org

(plus de détails dans le rapport de l'EMA en lien : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2015/07/WC500189480.pdf), visant notamment à promouvoir une approche bénéfice/risque utilisant mieux les données relatives à l'historique d'utilisation (post-AMM) et à diminuer en corollaire le nombre d'animaux utilisés en essais pré-AMM.

► LES START-UPS

De jeunes entreprises issues des organismes nationaux (CNRS, INSERM, Universités) émanant de laboratoires privés à l'issue de remaniement de sociétés (rachats, restructuration, etc.) ont également été créées. Elles sont en général de petite taille et se consacrent à des thématiques précises.

Contribution des PME innovantes pour industrialiser les méthodes alternatives.

Les évolutions réglementaires et les attentes de l'opinion en matière d'éthique créent des besoins de solutions alternatives. Les clients sont les industriels qui souhaitent disposer de nouvelles méthodes pour tester leurs produits ou d'outils de mesures. Ces besoins se retrouvent dans plusieurs domaines : l'industrie cosmétique bien entendu, mais aussi la mesure de la qualité de l'eau, l'agro-alimentaire, et de plus en plus l'industrie pharmaceutique et la chimie.

Les efforts de la recherche académique pour identifier des mécanismes, des biomarqueurs et mettre au point des modèles biologiques permettent d'aboutir à des méthodes alternatives. La loi sur l'innovation (1999) et les aides à l'innovation (Concours du Ministère, aides BPI) ont nourris la création d'entreprises dédiées au marché du diagnostic et de la recherche sous contrat.

Ces entreprises, le plus souvent essaimées de la recherche publique, prennent le relais quand il s'agit d'industrialiser et commercialiser les méthodes alternatives.

Sur le plan juridique, les méthodes innovantes proposées par les PME sont issues de savoir-faire universitaires ou d'organismes de recherches et font l'objet d'accord de licence entre ces organismes et les entreprises les exploitant.

Pourtant ces entreprises restent de petites tailles bien que le marché adressé soit gigantesque – à titre de comparaison la taille du marché de la recherche sous contrat en Europe dépasse les 12 milliards d'euros.

2. LES ACTEURS EUROPEENS

2.1 LE SECTEUR PUBLIC

▶ LA COMMISSION EUROPEENNE

Au sein de cette institution, au moins 5 directorats généraux (ou DG) rédigent, coordonnent, et/ou exécutent des programmes pour la promotion et le développement des méthodes alternatives.

▶ Direction Générale Santé et Consommateur (DG SANCO)

Sous la deuxième Commission Barroso (2009-2014), ce directorat était en charge du portfolio des cosmétiques. Ce n'est plus le cas sous la commission Juncker où le dossier des cosmétiques est retourné à DG GROWTH (voir plus bas). Néanmoins l'implication du DG SANCO envers les méthodes alternatives reste importante puisqu'il est en charge entre autres des produits pharmaceutiques et désormais de la définition de critères pour l'évaluation des perturbateurs endocriniens.

▶ Direction Générale Recherche et Innovation (DG RTD)

Le « programme cadre » de recherche pluriannuelle de l'Union Européenne (UE) rédigé par DG RTD a régulièrement financé le développement de nouveaux essais *in silico* et *in vitro* lors des précédentes éditions. Le tout nouveau programme de recherche cadre dénommé Horizon2020 (2014-2019) propose d'ores-et-déjà des appels à projets sur ces différentes technologies. A noter qu'un projet (PHC33) est dédié à l'évaluation de la sécurité exclusivement à partir de méthodes *in vitro* ou *in silico* (budget €30 millions). D'autres sources de financement sont également à prospecter autour des thèmes ou mots-clefs suivants en anglais : « *Systeme medicine, epidemiology, biomonitoring, bioinformatics and modelling, novel technologies and high-throughput, animal repositories and database, global approach to health.* »

▶ Direction Générale Centre Commun de Recherche (DG JRC)

En 1991, en réponse à la Directive 86/609, la Commission Européenne (EC) a créé le centre européen de validation des méthodes alternatives (CEVMA/ECVAM) hébergé au sein de l'institut pour la santé et protection du consommateur (IHCP – DG JRC). L'ECVAM a pour objectif de coordonner la validation de méthodes alternatives, de les promouvoir et de les diffuser, d'être un point de convergence des informations sur le développement de méthodes alternatives et de favoriser le dialogue entre législateurs communautaires et nationaux, industriels, scientifiques et Organisations Non Gouvernementales (ONG).

Depuis la publication de la Directive Européenne 2010/63/eu sur l'utilisation des animaux de laboratoires à des fins scientifiques, ECVAM a été rebaptisé EURL ECVAM : European Union Reference Laboratory - European Centre for the Validation of Alternative Methods. Son point focal avec les différents partenaires européens - tous secteurs confondus - a été renforcé. EURL ECVAM est également en charge de coordonner NETVAL, PARERE et ESTAF.

- NETVAL (European Union Network of Laboratories for the Validation of ALternative methods) : La mise en place de ce réseau réparti parmi les états membres consiste à assister EURL ECVAM lors d'exercices de validation de

méthodes alternatives. On y compte jusqu'à présent 26 laboratoires européens certifiés BPL dont deux en France (Ineris et CiToxLAB). L'état membre le plus représenté étant l'Allemagne avec 7 laboratoires suivi de l'Italie et de l'Espagne ex-aequo avec trois laboratoires.

- *PARERE* (EURL ECVAM's Network for Preliminary Assessment of Regulatory Relevance) : C'est le réseau dédié au dialogue avec les représentants des états membres et des agences réglementaires respectives afin d'établir quelles méthodes à valider en priorité.
- *ESTAF* (ECVAM Stakeholder Forum) : C'est le lieu de rencontre et d'échanges entre EURL ECVAM et les partenaires publics et privés. Au cours de ces réunions, EURL ECVAM informe du travail en cours et à venir. Les partenaires donnent leurs opinions et peuvent commenter les conclusions rendus par le comité scientifique indépendant (ESAC) sur les méthodes validées.

► **Direction Générale Entreprises et Industries (DG GROWTH)**

DG GROWTH est responsable de l'exécution du programme REACH avec ECHA (European Chemical Agency) et collabore avec l'industrie pour favoriser le développement de stratégies d'essais intégrés faisant appel à des modèles informatiques ou autres méthodes alternatives. Ce directeur est de nouveau en charge des produits cosmétiques sous la Commission Juncker. Sous sa responsabilité a été créé depuis 2005, EPAA (European Platform for Alternatives Approaches to Animal testing). Cet organisme a pour but de formaliser un dialogue et de faciliter les actions à mettre en place entre la CE, les syndicats professionnels et des entreprises représentées à titre individuel. Ce partenariat conduit par la CE implique tous les autres DG évoqués dans cette section (excepté DG TRADE), regroupe les compétences et les ressources nécessaires au développement et à l'acceptation réglementaire des méthodes alternatives. Tous les grands secteurs y sont représentés : cosmétiques, pharmaceutiques, chimiques, santé animale, détergents et les pesticides. L'organisation compte plus d'une trentaine de membres.

► **Direction Générale Environnement (DG ENV)**

DG ENV est en charge de la mise en place et du respect de la nouvelle Directive Européenne 2010/63/eu sur l'utilisation des animaux de laboratoires à des fins scientifiques remplaçant la Directive Européenne 86/609/cee. C'est ce directeur qui a pour mission - entre autres - de collecter les statistiques des états membres sur le nombre d'animaux, d'en publier le rapport européen, de veiller au respect de l'application et de la transposition de la directive dans chaque état membre. Dernièrement, la CE a annoncé avoir traduit les Pays-Bas devant la Cour de Justice Européenne en particulier pour la non-transposition de la législation 2010/63/eu. Elle a demandé à la cour d'imposer des astreintes journalières d'un montant de €51.156 jusqu'à ce que la législation soit transposée³⁵.

► **Direction Générale Commerce (DG TRADE)**

Dans le cadre des accords de partenariat transatlantique de commerce et d'investissement (TTIP) entre l'Europe et les Etats-Unis, la CE souhaite promouvoir davantage le développement de méthodes alternatives à l'expérimentation animale sur le dossier des produits cosmétiques. Un des objectifs du TTIP pour la CE est

³⁵<http://www.actu-environnement.com/ae/news/commission-pays-bas-cjue-recherche-animaux-23036.php4>

d'inciter les États-Unis de reconnaître les méthodes alternatives qui sont d'ores-et-déjà validées en Europe pour ce type de produits³⁶.

▶ LE CONSEIL DE L'EUROPE

- ▶ **DEQM**³⁷ (European Directorate for the Quality of Medicines) émane du Conseil de l'Europe et participe à l'élaboration des monographies de la Pharmacopée européenne. La Commission européenne de Pharmacopée engage depuis plusieurs années des efforts en matière de réduction, remplacement et optimisation de l'expérimentation animale. Ainsi de nombreuses monographies ont été révisées dont certaines ont abouti au remplacement définitif de l'animal (ex : méthodes de dosage physico-chimiques en remplacement des bioessais et l'abandon de la toxicité anormale pour les médicaments biotechnologiques).

Depuis 1994, l'DEQM a mis en place un programme de standardisation biologique dont l'un des axes de travail est la validation de méthodes alternatives 3R. A cette fin, des études collaboratives de validation sont organisées avec la participation de tous les partenaires intéressés, notamment les laboratoires nationaux de contrôle et les fabricants.

2.2 LES AGENCES EUROPEENNES

- ▶ **L'EFSA** (European Food Safety Authority) Autorité européenne de sécurité des aliments est en charge de l'évaluation des risques relatifs à la sécurité des aliments destinés à l'alimentation humaine et animale. L'EFSA fournit des avis scientifiques sur les risques existants et émergents. L'agence a publié en Janvier 2014 un rapport³⁸ sur les nouvelles méthodologies pour la caractérisation du danger chimique grâce aux "Omics", aux méthodes *in silico*, Adverse Outcome Pathways etc.
- ▶ **L'EMA** (European Medicine Agency) Autorité européenne de sécurité des médicaments a pour principale mission la protection et la promotion de la santé publique et animale à travers l'évaluation et la supervision des médicaments à usage humain et vétérinaire. L'agence lança en début d'année une consultation publique³⁹ (clôturé le 31 mai 2014) afin de réviser toutes ses lignes directrices pour être en adéquation avec le principe des 3R. Le rationnel évoqué par le groupe de travail indique que « *As science develops it is inevitable that some regulatory tests that were previously recommended will be superseded as a result of availability of new methodologies or will become redundant. There is a need to ensure that developments relevant to animal testing are reflected by corresponding updates to guidelines, and that guidelines do not include requirements and recommendations for unnecessary animal testing* ».
- ▶ **L'ECHA** (European Chemical Agency) a confirmé dans son dernier rapport⁴⁰ dédié à l'utilisation des méthodes alternatives aux tests sur animaux que les tests développés dans le cadre de « SEURAT-1 » (2011-2015, <http://www.seurat-1.eu/>) seront intégrées par la suite dans les guides officiels d'ECHA pour l'identification et

³⁶ <http://trade.ec.europa.eu/doclib/press/index.cfm?id=1076>

³⁷ DEQM report 2013

³⁸ <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/3638.pdf>

³⁹ http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/02/WC500161024.pdf

⁴⁰ http://echa.europa.eu/documents/10162/13639/alternatives_test_animals_2014_en.pdf

l'évaluation du risque pour les produits chimiques (réglementation REACH). Ce sera également le cas pour les tests d'allergie d'ici 2018. Le regroupement de projets « SEURAT-1 » continue de mettre à disposition ses résultats sur les méthodes alternatives de type *in vitro* et *in silico* à l'expérimentation animale.

2.3 LES INDUSTRIELS

Les industriels français travaillent essentiellement dans un contexte européen et international et participent à de nombreux programmes de recherche dédiés aux méthodes alternatives.

▶ LES ASSOCIATIONS D'INDUSTRIELS

▶ **CEFIC LRI (Chemical industry – Long Range Innovation initiative)**

L'association des industriels chimiques européens a mis en place un programme de recherche doté annuellement de €1 à €2 millions. Ce programme inclut régulièrement des projets qui déboucheront directement ou indirectement sur des méthodes alternatives à portée réglementaire.

▶ **Cosmetics Europe** (anciennement COLIPA jusqu'à 2012).

Si des industriels prennent l'initiative en développant les technologies nécessaires, le Comité de liaison européen des industries cosmétiques, des produits de toilette et de la parfumerie (COLIPA) coordonne depuis 1992 les efforts de l'industrie dans ce domaine.

Cosmetics Europe a ainsi mis en place un programme de recherche sur les méthodes de substitution à l'expérimentation animale, en collaboration avec les organismes européens et les institutionnels, visant à soutenir la mise au point, la validation et l'acceptation réglementaire de ces méthodes. Plusieurs méthodes ont déjà été soumises à EURL ECVAM pour validation, puis validées.

Au niveau international, Cosmetics Europe travaille avec l'ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) aux Etats-Unis, mais aussi avec le Canada, le Japon et l'OCDE. Cosmetics Europe participe également à la promotion des méthodes alternatives au plan international, par exemple au sein de l'ICCR (International Cooperation on Cosmetic Regulation) ou encore par ses contributions au congrès annuel mondial sur les méthodes alternatives.

Cosmetics Europe et la CE ont réalisé un partenariat public-privé afin de développer des méthodes alternatives pour les « endpoints » indiqués dans le 7^{ème} amendement de la directive sur les produits cosmétiques. De cette association est née « SEURAT-1 » projet de recherche de €50 millions qui se termine en 2015⁴¹.

▶ **EFPIA** (European Federation of Pharmaceuticals Industries and Associations)

EFPIA est l'un des acteurs majeurs des travaux de l'ICH visant à inscrire le concept des 3R dans les lignes directrices internationales relatives aux médicaments. EFPIA a notamment apporté une large contribution à l'abandon des tests de toxicologie aiguë conduits sur les petits rongeurs, dont la fiabilité est discutée pour tester les nouveaux médicaments avant qu'ils n'entrent en phase I d'essais cliniques chez l'Homme, ce qui représente environ 4% de la totalité des animaux utilisés en Europe.

⁴¹ Toward the replacement of *in vivo* repeated dose systemic toxicity testing – SEURAT-3- Volume 3 2013

Par ailleurs un partenariat entre EFPIA et la CE a été constitué dans le domaine de l'innovation pharmaceutique, L'IMI (Innovative Medicines Initiatives) - partenariat public-privé entre la CE et la fédération européenne des industries pharmaceutiques (EFPIA) – a comme mission essentielle d'améliorer la compétitivité de l'industrie pharmaceutique Européenne. Le précédent programme (IMI-1) a bénéficié d'une somme totale d' €1 milliard. Un grand focus a été mis dans les différents appels à projet sur le développement de modèle de cellules souches pluripotentes induites (IPSC) afin d'évaluer, non seulement la sécurité, mais aussi l'efficacité de futurs produits pharmaceutiques. Ce partenariat promeut donc indirectement le développement de méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Le nouveau programme (IMI-2 doté de plus €3 milliards) est en cours depuis juillet 2014 et poursuit des objectifs similaires⁴².

- ▶ **IVTIP : (*In vitro* Testing Industry Platform)** regroupe depuis 1993 une partie du secteur privé qui utilise, développe et/ou vend des méthodes *in vitro* dans le développement de nouveaux produits pharmaceutiques, cosmétiques etc. Cette organisation comprend plus d'une quarantaine de membres principalement des PME basées en Europe et organise deux séminaires annuellement. Ce forum promeut également activement les 3R.
- ▶ **IFAH-Europe (International Federation for Animal Health Europe, <http://www.ifaheurope.org/>)** représente les fabricants de médicaments vétérinaires et d'autres produits de santé animale en Europe. Ses membres sont à la fois des laboratoires pharmaceutiques internationaux et des associations nationales (dont le SIMV), couvrant ainsi 90% du marché européen. IFAH-Europe est activement impliquée dans la plateforme EPAA (European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing, voir cette rubrique) pour accélérer le développement, la validation et l'acceptabilité des approches alternatives, ainsi que dans les travaux de VICH visant à inscrire le concept des 3R dans les lignes directrices internationales relatives aux médicaments.

Récompenses et bourses 3R.

De nombreuses opportunités de financement privés et publics existent dont la dotation peut varier de €1000 à €200,000 toutes catégories confondues. Le site web alltox.org recense de manière exhaustive ces sources de financement. Le site financé par des ONG et industries américaines - compile également les différentes initiatives réglementaires qui incluent le principe des 3R.

2.4 PARTENARIAT PUBLIC ET PRIVE

- ▶ **EPAA (European partnership for alternative approaches to animal testing) :**

Cette plateforme de collaboration volontaire dénommée « partenariat européen pour la promotion des méthodes de substitution à l'expérimentation animale » a été lancée en 2005 et regroupe la Commission européenne, les organisations professionnelles européennes et, à l'heure actuelle 36 entreprises de sept secteurs de l'industrie. Ce partenariat travaille sur la priorisation, la promotion et la mise en œuvre de l'ensemble de la recherche fondée sur l'application des 3R. Il travaille également à améliorer la validation, l'acceptation et la mise en œuvre de solutions alternatives, dans les essais réglementaires et dans la prise de décision. A cet

⁴² M. Gunn, E Vaudano and M Goldman. The rationale use of animals in drug development: Contribution of the innovative medicines initiative. ATLA 40, 307-312, 2012

égard, l'EPAA vise à partager les expériences et d'évaluer la cohérence entre les sept secteurs industriels représentés. L'aspect opérationnel du programme de travail défini par l'EPAA est conduit par une plateforme de projets menée conjointement par la Commission et des partenaires de l'industrie.

Les projets en cours, essentiellement dédiés aux produits chimiques et au médicament sont :

- Les cellules souches pour le développement de nouvelles approches pour la caractérisation du danger potentiel.
- Faire progresser les 3R dans la réglementation en toxicologie
- Exposition / prédiction, développer des outils *in vitro* dans l'évaluation des risques encore trop focalisée sur l'utilisation de méthodes sur l'animal.

D'autres projets portés au niveau international ont pour objet la réduction des tests sur animaux dans le domaine des vaccins :

- Le projet d'approche Cohérence avec la création d'une plateforme technique pour les vaccins humains et vétérinaires vise essentiellement au remplacement des tests *in vivo* et à la mise en œuvre d'une stratégie politique de réduction des méthodes *in vivo* dans la procédure de libération des lots.
- Le projet d'harmonisation internationale des tests réglementaires 3R appliqués aux produits biologiques⁴³.

3. LES ACTEURS INTERNATIONAUX

- ▶ **ICTAM**⁴⁴ (International Co-operation on Alternative Test Methods) regroupe depuis 2009 l'ensemble des institutions qui s'occupent de validation de méthodes alternatives. Y sont représentés: ICCVAM (Etats-Unis), JACVAM (Japon), KOCVAM (Corée du Sud), Health Canada et EURL ECVAM (UE). L'objectif consiste à reconnaître par tous les partenaires la méthode alternative validée par l'un d'entre eux. Cela permet d'éviter de dupliquer les efforts et facilitent l'harmonisation lors des évaluations pour la sécurité des produits quel que soit le marché.
- ▶ **CAAT** (Center for Alternatives to Animal Testing) est un département académique rattaché à l'école de santé publique de l'université Johns Hopkins aux États-Unis. CAAT promeut depuis 1981 la dissémination des 3R en finançant chaque année des projets de recherche sur le raffinement des expérimentations animales. Depuis 2008, CAAT mène en particulier des travaux de recherche sur la toxicité du développement neurologique et l'irritation de la peau. En 2011, CAAT décrocha une bourse de \$6 millions octroyé par le NIH (National Institute of Health). Le projet nommé le "Human Toxome" décrit une approche holistique consistant à identifier et cartographier les voies de toxicités responsables de la perturbation du bon fonctionnement de la cellule et de sa mort cellulaire. En 2010, une antenne de CAAT s'est ouverte au sein de l'université de Konstanz et développe des activités similaires sur le continent européen.

⁴³ <http://www.efpia.eu/uploads/Modules/Documents/report-epaa-biologicals-workshop-2015-list-final.pdf>

⁴⁴ ITCAM alternative test methods validation and regulatory acceptance. January 2014 status report for ICCR

▶ **TOX21**⁴⁵

Les agences de recherche fédérale et les agences réglementaires américaines ont formé une alliance intitulée "Toxicologie pour le 21^{ème} siècle" ou "Tox21". Cette alliance associe le NIH (National Institute of Health), US EPA (Environmental Protection Agency) en 2007 et la FDA (Food and Drug Administration) qui les rejoint en 2010.

L'objectif est de mettre les fonds en commun et de moderniser les techniques de travail dans l'évaluation du risque au sein des agences. Pour ce faire, elles décident d'utiliser au maximum les nouvelles technologies (i.e. *in silico*, *in vitro*, *plateforme robotisée etc.*) afin de générer rapidement des informations sur plus de 10,000 molécules ayant une toxicité putative ou avérée. En effet, ils considèrent que le modèle *in vivo* n'est pas adapté à ce travail de dépistage à cause d'un faible rendement (information obtenue vs temps) et d'un coût élevé.

▶ **OCDE** (Organisation de Coopération et de Développement Economique)

Au niveau international, l'OCDE a adopté, pour la première fois en 2004, des méthodes destinées à remplacer les essais sur les animaux et ce dans la continuité des activités de coordination de la recherche et de validation de la Commission. Ainsi l'acceptation réglementaire a été obtenue pour de nombreux essais *in vitro* ou *ex vivo*, notamment pour des dangers tels que l'irritation et la corrosion de la peau ou de l'œil, la génotoxicité, la perturbation endocrinienne, et bientôt pour la sensibilisation de la peau.

L'OCDE affiche la volonté de promotion des 3R notamment par la participation en tant qu'experts contributeurs d'ICAPO (ONG internationale de protection des animaux).

De par ses activités sur les perturbateurs endocriniens, l'OCDE coordonne également ses propres travaux de validation en appui avec les organismes de validation tels que l'EURL ECVAM et l'ICCVAM (USA). Par ailleurs, un groupe spécifique de management de la validation (VMG) pour les méthodes dites non animales a été établi pour le suivi de ces activités.

▶ **ICH** (International Conference of Harmonisation)

Le processus ICH (International Conference of Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use) qui regroupe les Autorités Pharmacopées et les Entreprises du médicament d'Europe, des Etats-Unis et du Japon a conduit à une harmonisation presque complète du dossier toxicologique. Le principal objectif des réglementations est la protection de la santé publique et du patient. 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 de l'animal de laboratoire pour la partie préclinique du dossier. Pour prendre en compte les avancées de la science et des techniques, une revue de certaines lignes directrices a été entreprise en 2008 et l'un des objectifs principaux est de mettre en place, à chaque fois que cela est possible, des mesures visant à la diminution du nombre d'animaux nécessaires.

Récemment, l'ICH a adopté la ligne directrice S10 pour l'évaluation de la phototoxicité des produits pharmaceutiques (ICH 2013) préconisant l'utilisation de

⁴⁵ National toxicological program- A National toxicological program for the 21st Century. A road map for the 21st Century.

méthodes *in vitro*⁴⁶, cette ligne directrice est actuellement en phase de mise en œuvre au niveau de l'Union européenne (2014), du Japon et des Etats-Unis (2015).

- ▶ **VICH** (International Coopération on harmonisation of technical requirements for registration of veterinary Medical products)

Le VICH est un programme multinational (Union européenne, Japon, États-Unis) destiné à harmoniser les études et données demandées par les autorités des pays et régions faisant partie du VICH pour les autorisations de mise sur le marché des produits à usage vétérinaire.

De la même manière que l'ICH pour les médicaments à usage humain, l'un des objectifs du VICH est d'établir et mettre en œuvre l'harmonisation des exigences réglementaires pour les médicaments vétérinaires dans les régions VICH. Ces exigences doivent satisfaire à des normes élevées de qualité, de sécurité et d'efficacité, et minimiser l'utilisation des tests sur les animaux.

A ce titre, depuis 2008, EURL ECVAM travaille sous l'égide de l'EMA avec des experts des 3 régions du VICH pour l'élaboration d'une ligne directrice visant à harmoniser les critères de dispense de l'utilisation de l'animal dans les tests de sécurité des vaccins vétérinaires dans le cadre de la procédure de libération de lots⁴⁷. Cette ligne directrice a vocation d'éviter la répétition des tests par la reconnaissance des résultats obtenus dans les autres régions participantes. D'autres lignes directrices sont en préparation.

Le sujet des méthodes alternatives en expérimentation animale dans le domaine des médicaments vétérinaires a été discuté lors de la 5^{ème} conférence du VICH en octobre 2015 à Tokyo.

- ▶ **LA COOPERATION INTERNATIONALE**

Le développement des méthodes alternatives à l'expérimentation animale en particulier pour une utilisation réglementaire doit être considéré à l'échelle internationale. L'Europe ne peut agir isolément mais doit promouvoir ses activités au niveau mondial grâce à des approches harmonisées au niveau international.

La Commission et l'EPAA travaillent en collaboration avec l'OCDE et d'autres organisations internationales afin d'atteindre des résultats harmonisés à l'échelle mondiale. Les solutions de substitution possibles en matière d'expérimentation animale ont été au centre des préoccupations de l'ICCR (International Collaboration on Cosmetics Regulation) qui est un forum de coopération entre les autorités réglementaires des Etats-Unis, du Brésil, du Canada, du Japon et de l'UE (<http://www.iccrnet.org/>). La coopération internationale ITCAM, y compris l'EURL ECVAM de l'UE, et les services correspondants de la Corée du Sud, du Japon, des Etats-Unis, du Canada et du Brésil, travaillent conjointement sur le processus de validation, sur l'élaboration à l'échelle internationale de lignes directrices et d'orientation ainsi que sur la diffusion et la promotion de méthodes de remplacement à l'échelle mondiale.

⁴⁶ Essai de photo-toxicité 3T3 NRU (TG OCDE 432)
ROS assay (Onoue *et al.* 2013)

⁴⁷ VICH GL50 (BIOLOGICALS: TABST). Harmonisation of criteria to waive target animal batch safety testing for inactivated vaccines for veterinary use. February 2013. <http://www.vichsec.org/activities/dates-of-next-meetings/next-vich-conference.html>

VI - LES RECOMMANDATIONS ET LE ROLE DE FRANCOIPA DANS LEUR MISE EN ŒUVRE

Cinq ans après la première analyse de FRANCOIPA, la directive ([2010/63/EU](#)) sur l'utilisation de l'animal à des fins expérimentales a été transposée et appliquée, les connaissances sur le vivant et les outils d'investigation associés ont continué à évoluer. Ainsi certaines des actions identifiées en 2011 n'ont plus lieu d'être, tandis que d'autres ont été menées à terme.

Au plan européen, les travaux pour le réexamen de la directive, prévue en 2017, ont démarré. Par ailleurs, l'initiative citoyenne européenne de 2012 « Stop Vivisection » a relancé le débat. Enfin, de nombreux pays se sont dotés de « 3R center », destinés à financer ou à réaliser des développements de méthodes.

Le contexte a aussi évolué au plan national comme la publication d'un rapport parlementaire sur l'expérimentation animale⁴⁸ l'indique. Pour la toxicologie et l'écotoxicologie prédictive la discussion sur le choix des méthodes pertinentes était très cantonnée aux exigences réglementaires. De plus en plus, le besoin de caractérisation des dangers de substances, et donc d'outils adaptés à cette caractérisation répond à une demande sociétale plus globale. Des besoins de hiérarchisation et de ciblage des politiques publiques (plan Ecophyto, Plan National Santé Environnement, Stratégie Nationale Perturbateurs Endocriniens, Plan Micropolluants dans l'eau etc.) requièrent de connaître substances émergentes ou perturbateurs endocriniens.

L'évolution la plus marquante est sans doute la montée en puissance des préoccupations relatives aux « 3R » dans le domaine de la recherche en sciences de la vie. La structuration des Alliances (ALLENVI et AVIESAN) jointe aux impératifs de la nouvelle directive, la prise en compte des préoccupations sociétales mais aussi celle des progrès des connaissances, de la croissance du coût des infrastructures y ont contribué. Ces éléments ont conduit au développement d'une réflexion sur la recherche animale entre les alliances. Un groupe de travail AVIESAN s'est formé sur le sujet, et l'INSERM a intégré cet aspect dans la première priorité de son « plan stratégique 2020⁴⁹. ».

Les recommandations faites ici tiennent compte de ce contexte et de ces initiatives. Les 5 axes de proposition retenus initialement sont toujours valides, même si les contenus ont pu évoluer :

- Eviter les expérimentations superflues
- Intégrer les méthodes alternatives dans l'enseignement
- Orienter la recherche et le développement vers des outils novateurs
- Construire, faire connaître et reconnaître les nouvelles approches et leurs opérateurs.
- Définir des politiques par domaine et évaluer leur avancement.

Le texte ci-après les reprend et développe 16 propositions concrètes. Les paragraphes ci-après reprennent, pour chaque préconisation les enjeux, le bilan, les nouvelles recommandations et les axes de progrès. Il précise l'appui que FRANCOIPA peut y apporter.

⁴⁸ Office Parlementaire pour l'évaluation des Choix Scientifiques et technologiques (2009), Rapport sur l'expérimentation animale en Europe, Quelles alternatives ? Quelle éthique ? Quelle gouvernance ? Par MM. Michel Lejeune et Jean-Louis Touraine, Députés.

⁴⁹ Objectif 4 de la priorité 1 du plan stratégique INSERM 2020. <http://dircom.inserm.fr/plan-strategique>

Il faut noter qu'un axe de travail important, « construire la recevabilité par les parties prenantes des méthodes alternatives » n'est pas développé ici en tant que tel. Des institutions européennes comme l'EPAA⁵⁰ en font un axe de promotion, ou d'autres comme le laboratoire commun de la Commission (JRC-ECVAM) en réalisent le suivi. Pour FRANCOPA, dont l'objet premier est justement la promotion des méthodes, cet axe n'est pas à mettre à part, mais constitue le fil directeur de l'ensemble des recommandations décrites ci-après. Il faut rappeler que FRANCOPA représente à travers ses quatre piliers les différents acteurs impliqués dans le développement des méthodes alternatives et l'application de la règle des 3R.

Eviter les expérimentations superflues

Bien qu'il s'agisse d'un impératif élémentaire et d'une obligation légale, des recommandations sur le sujet ont été jugées nécessaires par FRANCOPA, car leur mise en œuvre pratique demande une réflexion poussée et une traduction en règles concrètes.

Des moyens de répertorier et de regrouper les données doivent permettre de déterminer si l'information recherchée est déjà accessible grâce à des résultats disponibles de nature proche.

Il faut être capable d'avoir des méthodes statistiques qui minimisent les essais et un processus qualité qui rende inutile la répétition des expériences. Mais il faut également savoir décider quand une répétition est nécessaire.

Il faut pouvoir déterminer si une nouvelle expérimentation peut être considérée comme étant superflue, par exemple, quand l'exposition à une substance est impossible. C'est la notion de « dispense » dans les réglementations, sur laquelle FRANCOPA a organisé un séminaire international en 2011⁵¹.

1. Accélérer l'optimisation des processus de contrôle et des procédures d'essai

Les recommandations suivantes s'appliquent aux expérimentations réglementaires, en particulier pour l'évaluation de la sécurité des produits mis sur le marché. Grâce à une bonne efficacité d'optimisation pour les médicaments et notamment les vaccins, les expérimentations *in vivo* ont significativement diminuées⁵². Par exemple, l'ANSM, partenaire de FRANCOPA, participe très activement aux travaux 3R de la pharmacopée cependant malgré les progrès réalisés à ce jour, le sujet reste d'actualité⁵³.

⁵⁰ European Partnership for alternative approaches to animal testing (partenariat de la commission européenne avec des industriels)

⁵¹ « Waiving animal testing for regulatory purposes », 1^{er} septembre 2011, Paris.

⁵² En France, 2,2 millions d'animaux ont été utilisés à des fins scientifiques en 2010, tandis que 2,3 millions ont été utilisés en 2007. Il apparaît que le nombre d'animaux utilisés est constant depuis 1999. Il représente une diminution de 40% en comparaison à la première analyse statistique en 1990. (<http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/cid70613/enquete-statistique-sur-l-utilisation-des-animaux-a-des-fins-scientifiques.html>). Le nombre total a encore diminué à 1,8 millions en 2014, mais avec un référentiel statistique différent.

⁵³ Voir la deuxième newsletter FRANCOPA : « Contribution et application par l'ANSM de la stratégie 3R dans le cadre de la libération des médicaments immunologiques à usage humain »

Propositions

- Optimiser les procédures statistiques utilisées dans les expérimentations animales, et notamment dans les recherches et évaluations réglementaires pour le médicament vétérinaire et le médicament à usage humain. Le renforcement de l'assurance qualité des procédés, la mise en œuvre séquentielle des essais dans les lots, font partie des approches encore améliorables⁵⁴. Dans ce contexte fortement internationalisé, une action nationale existe déjà et doit être encouragée en particulier dans le domaine de la toxicologie, très réglementé mais où des progrès sont possibles.
- Evaluer et encourager l'enrichissement des procédures d'essai actuelles, en introduisant de nouvelles observations (exemple : marqueurs d'action de perturbation endocrinienne dans des essais déjà existants)
- Les représentants français dans les groupes d'experts doivent contribuer à l'évolution des pratiques internationales aux niveaux de l'ECHA, EFSA, EMA etc. en étant porteurs de propositions dans ces domaines.

- *FRANCOPA identifiera de nouvelles approches qui pourraient faire l'objet d'une action de promotion et fournira des éléments aux représentants Français.*

2. Organiser les dispositifs d'échange et l'utilisation des résultats acquis

La question se pose, quoiqu'en des termes différents, dans le domaine réglementaire et en recherche. Les rapprochements des équipes d'expertise réglementaires en France⁵⁵ est un acquis à exploiter, mais il ne lève pas les obstacles juridiques de propriété et confidentialité. Les essais réalisés sur la même substance dans des cadres réglementaires différents ne sont pas forcément communicables d'un domaine à l'autre. Les expérimentations en recherche peuvent être trop spécifiques pour être utilisables dans d'autres problématiques. Les réflexions au sein d'AVIESAN ont mis en évidence des pistes d'amélioration.

Propositions

- Formaliser une réflexion juridique avec les parties intéressées en France sur la levée des obstacles à la communication des informations entre systèmes réglementaires, en cohérence avec les dispositions européennes.
- Concevoir, pour les expérimentations relatives à la recherche, les modalités d'exposition (dose, nombre de doses, voies) de recueil et un format des données de façon à ce qu'une quantité maximale d'informations soit extraite d'une même cohorte d'animaux dans des conditions standardisées, afin que de nouvelles expérimentations ne soient pas rendues nécessaires par manque d'anticipation.

- *FRANCOPA a initié le dialogue avec les agences concernées par les 3R, ANSM et ANSES, ainsi qu'avec les Ministères en charge de la recherche, de l'environnement et de*

⁵⁴ Voir les bilans des évolutions sur la Pharmacopée, le descriptif des actions de l'ANSM

⁵⁵ FRANCOPA note que l'opportunité offerte par le rapprochement AFSSA-AFSSET dans l'ANSES, et le regroupement du traitement des dossiers de diverses recommandations : REACH, Phytosanitaires, Biocides.

l'agriculture cependant il demande à être développé. Ce pourrait être par la mise en place d'un GT chargé de faire des propositions concrètes sur ce sujet.

- *FRANCOPA peut contribuer à nourrir le débat sur ce thème et faciliter la mise en place des bonnes pratiques qui permettent sa réalisation.*

3. Promouvoir la publicité et l'accès aux résultats négatifs

Une des sources principales de la mise en œuvre de projets ou de procédures superflues vient du manque d'information sur les résultats négatifs⁵⁶, déjà obtenus dans le domaine. Ces résultats font rarement l'objet d'articles publiés et s'ils se trouvent dans des rapports, ceux-ci ne sont pas forcément accessibles. Il est donc urgent d'accélérer l'effort engagé pour promouvoir l'accès à ces données.

Propositions

- Etablir un système français afin de faire connaître les résultats négatifs entre opérateurs français dans l'industrie, et mobiliser les acteurs de la Recherche, notamment en permettant le dépôt sur des sites du type HAL (voir HAL INSERM⁵⁷ par exemple).

- *L'INFOCENTRE de FRANCOPA peut contribuer à ce système d'identification par des facilités de stockage et de mise en visibilité pour l'archivage des résultats négatifs.*

Intégrer les méthodes alternatives dans l'enseignement des sciences de la vie

Il est recommandé que la formation des acteurs des sciences de la vie et de la santé intègre les méthodes alternatives.

4. Formation générale

L'intérêt et les limites scientifiques du modèle animal, la question de la souffrance et les méthodes alternatives doivent faire partie de l'enseignement supérieur en sciences biologiques (DUT, BTS, Licence, Master), pharmacie, médecine humaine et vétérinaire, sciences agronomiques et agroalimentaires car les futurs professionnels dans ces domaines pourront tous se trouver en position d'avoir recours ou de demander des expérimentations animales. Une réflexion a été élaborée par un des Groupes de travail de FRANCOPA, le GT « enseignement ».

Les objectifs de ces formations pourraient comporter les points suivants : intérêt et limites des méthodes alternatives ; domaines d'application des méthodes alternatives ; principales instances européennes impliquées dans les méthodes alternatives ; cadres réglementaires dans lesquelles s'inscrivent les méthodes alternatives ; position des méthodes alternatives dans le cadre de la recherche.

⁵⁶ cf. le « Journal of Negative Results in BioMedicine » ou le « Journal of Pharmaceutical Negative Results »

⁵⁷ Portail Inserm de l'archive ouverte nationale pour le dépôt en ligne des travaux scientifiques <http://www.hal.inserm.fr/>

Proposition

- En plus des futurs professionnels susceptibles de produire ou d'avoir à évaluer des données provenant de l'expérimentation animale et des méthodes alternatives, il est important de former à ces thématiques les futurs enseignants du primaire et du secondaire. Une intervention dans les Ecoles Supérieures du Professorat et de l'Education (ESPE) est essentielle. Il serait également opportun d'inclure dans le programme de SVT de terminale une sensibilisation à l'Expérimentation Animale, l'éthique animale et les 3R.

5. Formations spécifiques

Le « GT enseignement » de FRANCOPIA a pris note que les formations pour les professionnels de l'expérimentation animale intègrent déjà l'enseignement des méthodes alternatives. Cependant elles pourraient être développées à tous les niveaux de formation. L'objectif général étant que l'apprenant ait les informations nécessaires pour sélectionner le modèle le plus pertinent pour répondre à sa question scientifique ou puisse mettre en place une stratégie de tests intégrés (ITS) avant de recourir à l'animal.

Propositions

- Mettre à jour régulièrement le programme spécifique concernant les méthodes alternatives dans la formation des professionnels de l'expérimentation animale (arrêté du 1 février 2013),
- Dispenser un enseignement spécifique⁵⁸ pour les experts évaluateurs réglementaires en charge de la toxicologie, de l'écotoxicologie et du contrôle pour qu'ils puissent jouer un rôle de moteur dans le processus d'application des 3R et dans la reconnaissance des méthodes alternatives dans les dossiers réglementaires.
- Organiser des journées de sensibilisation sur les mêmes sujets pour leurs responsables.
- Intégrer aux formations opérationnelles en France les programmes et cours qui se développent dans différents pays européens avec le support de la Commission.

- *FRANCOPIA a fixé à son « GT enseignement » la mission de proposer une formation aux évaluateurs réglementaires qui sont recrutés au niveau master et dont la formation initiale n'inclue généralement pas la notion des 3R. Le groupe de travail propose de mettre en place des formations thématiques pour les évaluateurs réglementaires selon un schéma pédagogique précis et détaillé. Des échanges avec les agences potentiellement intéressées sont en cours.*

⁵⁸ Notamment pour mieux comprendre et analyser la portée des nouvelles méthodes (approches intégratives par exemple) pouvant être utilisées dans l'évaluation de la sécurité.

6. Accroître le recours aux simulations dans l'enseignement

Les supports audio-visuels et les simulations informatiques doivent être utilisés quand l'enseignement est destiné à transmettre une connaissance théorique lors de certaines étapes de l'apprentissage d'une pratique.

Le Ministère en charge de la recherche a passé commande à la CNEA (Commission nationale de l'expérimentation animale) d'un état des lieux sur l'utilisation des animaux d'expérimentation dans l'enseignement supérieur. Ce rapport fait ressortir le fait que le nombre d'animaux utilisés en Travaux Pratiques a nettement diminué au cours de ces dernières années grâce à un recours accru à l'enseignement assisté par ordinateur, aux vidéos, aux mannequins de petits animaux ou aux cultures cellulaires. Ces méthodes sont encore peu ou mal connues par les responsables d'enseignement⁵⁹.

Proposition

- Recenser les outils disponibles dans ce domaine et de favoriser leur diffusion.

Orienter la recherche vers des outils novateurs

Il n'existe pas au plan national de programmes fléchés « 3R » comme au Royaume Uni (NC3R) ou dans d'autres pays de l'Union Européenne de sorte que les développements ne sont pas encouragés ni identifiables.

Les recommandations sont les suivantes :

7. Mettre en place un « centre 3R » pour financer les développements spécifiques.

De nombreux pays sont dotés de tels centres. Ailleurs qu'en Europe, une institution comme l'EPA consacre une partie de son budget aux développements d'outils.

Ce centre doit accompagner des démarches spécifiques comme celles de la toxicologie, l'écotoxicologie ou la pharmacodynamie.

Propositions

- Mettre comme objectif central le fondement scientifique des approches intégratives en toxicologie, « Integrated Testing Strategies », les « Adverse Outcome Pathways »
- Effectuer le retour d'expérience sur les financements de développement de méthodes
- Identifier les besoins de recherche et développement de méthodes alternatives
- Conduire une analyse du mode opératoire des centres 3R européens afin de comparer les différentes options déjà existantes.
- Mettre en place des programmes incitatifs dans le domaine des 3R par un dispositif spécifique.

⁵⁹ Le prix de biologie Alfred Kastler 2013 s'inscrit dans ce contexte. Il a été attribué à Catherine VOGT, vétérinaire, ingénieur de recherche à l'université Lyon I. Formation en technique chirurgicale appliquée à l'expérimentation, sans utilisation d'animal vivant.

- *FRANCOPA doit promouvoir plus clairement des concepts mis en avant dans le rapport de l'académie de sciences américaines sur l'approche de la « toxicologie du vingt-unième siècle⁶⁰ » et faire comprendre que les « outils novateurs » ne se limitent pas à la toxicologie, mais sont ceux de la compréhension du vivant. Pour mener à bien cette tâche FRANCOPA diffusera les informations concernant les avancées et les perspectives réglementaires des AOP et IATA⁶¹.*

Construire, faire connaître et reconnaître les nouvelles approches et leurs opérateurs

Les laboratoires de recherche en France développent de nombreuses méthodes et modèles susceptibles de remplacer ou de réduire l'expérimentation animale. Ce peut-être afin de compléter les études expérimentales chez l'animal pour mieux comprendre des mécanismes physiologiques ou simplement parce que les recherches de biologie cellulaire et moléculaire se font a priori *in vitro*, en particulier sur des cultures de cellules souches ou différenciées, souvent d'origine humaine.

Ces laboratoires ne considèrent pas forcément qu'ils développent des méthodes utilisables pour d'autres applications plus finalisées. De plus, ils jugent généralement que leur rôle n'est pas de développer des essais ou modèles d'application finalisée.

Il faut donc construire une dynamique de transfert de ces méthodes vers une application industrielle et réglementaire. Ceci requiert d'aborder la question de la valorisation de la recherche appliquée, des cloisonnements entre recherches publique et privée, mais aussi entre disciplines (toxicologie, médecine, etc.) et entre secteurs industriels (pharmacie, chimie, etc.).

L'enjeu est la valorisation de la recherche appliquée, et le décroisement entre secteurs précédemment évoqué.

Dans un premier temps, afin de répertorier et partager les informations et les avancées scientifiques dans le domaine des méthodes alternatives entre les différents secteurs FRANCOPA a créé un INFOCENTRE opérationnel depuis 2012 (<http://www.francopa.fr/>). Cinq lettres d'information ont été publiées et les actualités sur les 3R sont aussi régulièrement diffusées par courrier électronique à tous les inscrits. Des actions plus conséquentes sont toutefois nécessaires.

8. Passer de la recherche à des outils opérationnels appuyés sur un réseau de ressources

Cette structuration d'un aval de la recherche fondamentale est partiellement réalisée avec le réseau ANTIOPEs et la stratégie de recherche en Toxicologie et écotoxicologie. Elle est à mettre en cohérence avec l'avancée des alliances (AVIESAN, AllEnvi, etc.) dans ces secteurs. Il s'agira de viser un renforcement des collaborations entre chercheurs en recherche médicale, sciences du vivant et en toxicologie ainsi qu'une clarification des règles d'accès aux grandes infrastructures.

⁶⁰ http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=11970

⁶¹ AOP = « Adverse Outcome Pathway » (chemin de l'effet adverse) ; IATA « Integrated Approach on Testing and Assessment », (Approche Intégrée de Tests et d'Evaluations)

Cette dynamique doit être articulée avec l'initiative IFRES⁶² autour de la possibilité de créer ou de s'associer à des fondations pour assurer le développement de l'innovation. Elle doit se structurer à partir de réseaux de recherche construits autour de cette finalité, et d'un pôle applicatif rassemblant des équipements, et de fondations pour assurer le développement de l'innovation.

Propositions

- Structurer la chaîne passant de l'identification du concept, sa validation, la mise au point de protocoles et procédés, le transfert à des développeurs et à des opérateurs pionniers (Start-ups)
- S'appuyer sur la mise en partage de ressources : bases de données sur les QSAR, Omics, plateforme de calcul, plateforme d'analyse haut débit, moyens d'essais *in vitro* et *in vivo*.
- Rassembler des partenaires industriels, la recherche amont et la recherche appliquée.

9. Se doter des moyens de faire reconnaître la qualité des méthodes innovantes (normalisation, certification volontaire, autres processus de validation)⁶³

Comme d'autres pays européens, la France doit disposer d'une structure permettant aux développeurs de procédés et d'outils, qu'il s'agisse de toxicologie, de contrôle, d'investigation ou de toute autre application, d'obtenir un label de qualité pour que ces méthodes soient reconnues au niveau international sous l'angle de la pertinence scientifique mais aussi de l'assurance qualité. L'exemple des divergences entre l'avis de l'ANSES et de l'EFSA sur la caractérisation toxicologique du Bisphénol A en fonction des résultats des études expérimentales qui n'ont pas été réalisées selon les lignes directrices de l'OCDE (et/ou selon les « Bonnes Pratiques de Laboratoire ») montre l'importance de cette démarche⁶⁴.

Ce point de passage, demandé dans la Stratégie Nationale Perturbateurs Endocriniens est un atout dans certaines logiques réglementaires (cf. REACH), même s'il ne suffit pas toujours. Mais il l'est aussi pour l'utilisation dans les publications scientifiques ou toute autre application.

⁶² Initiative Française pour la recherche en environnement-Santé, coordonnée par l'inter-alliance et visant à définir la recherche, assurer le suivi, représenter les forces de recherche auprès des institutions et des agences internationales et nationales

⁶³ En ce qui concerne le Remplacement, le choix du modèle expérimental ne doit être fait qu'en fonction de la question scientifique posée par le porteur de projet. Néanmoins, il apparaît qu'une assistance au choix du modèle et à la conception de projet (proposition 1) doit permettre en quelques années de stimuler l'utilisation de modèles *ex vivo* (cultures 3D, cellules souches,) ou *in silico* (bioinformatique etc.) au préalable ou en remplacement de certaines expérimentations réalisées sur des rongeurs, d'encourager et soutenir l'utilisation d'espèces modèles moins « sensibles » tels que les poissons, les amphibiens, les arthropodes ou les organismes marins et de bien connaître l'ensemble des modèles existants et de leurs modalités d'utilisation et potentialités. Les recherches menées dans les stations biologiques marines couvrent l'étude des organismes marins et le développement de nouveaux modèles biologiques. Une rencontre annuelle (proposition 2) organisée par le BEA en partenariat avec les réseaux (EFOR, ROCAD CELPHEDIA, EMBRC) et FRANCOPIA devra se mettre en place pour établir un bilan de l'existant et assurer le suivi de l'émergence des nouveaux modèles permettant ainsi d'optimiser le remplacement.

⁶⁴ <https://www.anses.fr/fr/system/files/SUBCHIM2015sa0049.pdf>

Ces analyses de la qualité des outils ne se limitent pas aux seuls essais, comme l'a montré le séminaire dédié au « read-across » dont le compte-rendu est disponible sur le site web FRANCOIPA⁶⁵, et dont le thème a été repris au niveau international par un séminaire ECOIPA –CAAT⁶⁶.

Propositions

- Organiser une plateforme avec des réseaux de moyens d'essai pour l'organisation d'inter-comparaisons, *in vitro*, mais aussi *in silico*, ou en imagerie.
- Inscrire cet outil dans les réseaux européens et non-européens⁶⁷.
- Etendre cette exigence à l'ensemble des essais et méthodes pour les sciences de la vie.

10. Structurer l'apport national à la validation réglementaire

Il est nécessaire de s'assurer que les instances françaises dans les groupes internationaux puissent porter des positions proactives, et assurent un retour vers les acteurs nationaux.

Propositions

- Renforcer la présence dans les Comités internationaux (ISO, OCDE, CEN).
- Soutenir les experts désignés dans ces groupes en leur assurant la connaissance du potentiel des méthodes innovantes et des liens avec des référents au niveau national.
- Mettre en réseau les agences et institutions scientifiques dans ce but.
- Adopter une approche exemplaire dans les expertises nationales.

⁶⁵ www.francoipa.fr/web/pdf/francoipa/Colloque_read_across.pdf

⁶⁶ <http://cefic-lri.org/events/caat-europe-and-cefic-lri-workshop-2016-good-read-across-practices-making-it-work-for-you/>

⁶⁷ S'inspirer, par exemple, de la manière de procéder qui a été adoptée par les pays voisins avec la mise en place d'organismes qui accompagnent la directive sur l'utilisation des animaux à des fins expérimentales (ex. le NC3Rs au Royaume Uni, le centre 3R danois, la plateforme belge).

11. Promouvoir la préoccupation 3R dans les démarches de recherche sur le vivant

Il est maintenant admis de plus en plus largement que l'expérimentation animale et les 3R sont des enjeux pour la recherche, y compris pour la recherche en amont. Les institutions réfléchissent à ce sujet. Deux suggestions sont évoquées ici.

Propositions

- Inciter les grandes institutions de recherche à adopter et diffuser les lignes directrices du type ARRIVE⁶⁸, CAMARADES⁶⁹ etc.
- Effectuer le retour d'expérience sur les 3R au sein des programmes de recherche comme ceux de l'ANR.

12. Faire connaître les acteurs et outils opérationnels disponibles

Les outils expérimentaux alternatifs et les acteurs capables de les mettre en œuvre ne sont pas assez connus. La question est posée tant au niveau de l'Union Européenne qu'au niveau mondial. Des initiatives sont mises en place à ces échelles. Les acteurs sont ceux de la recherche mais aussi ceux des laboratoires qui développent et réalisent des prestations.

Propositions

- Centraliser cette information au plan national, en cohérence avec des initiatives européennes comme celle de l'EURL ECVAM.
- Utiliser l'INFOCENTRE d'ECOPA, en coopération avec les initiatives des plateformes nationales d'ECOPA, et l'EPAA.

13. Intégrer la démarche aux stratégies nationales de recherche

Le besoin de méthodes 3R doit être intégré dans la conception de la stratégie nationale sur la toxicologie et l'écotoxicologie⁷⁰ que pilote aujourd'hui le ministère en charge de la Recherche en application des recommandations dans le domaine (Programme National Santé Environnement, Comité Opérationnel « Recherche » du Grenelle de l'Environnement, loi Grenelle 1). Les propositions en cours (pôles applicatifs, renforcement de l'enseignement, structuration régionale et structuration des plateformes et plateaux techniques) fournissent un cadre avec lequel FRANCOPA estime que ses propositions doivent s'articuler.

Ces méthodes, y compris celles qui ne relèvent pas de la toxicologie, doivent aussi être intégrées à la stratégie du domaine de la santé, par exemple en lien avec le développement de l'Alliance nationale pour les sciences de la vie et de la santé et à la structuration associée au Grand emprunt. L'objectif est partiellement réalisé dans le cadre de l'IFRES⁷¹.

⁶⁸ Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments <https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>

⁶⁹ Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies <http://www.dcn.ed.ac.uk/camarades/>

⁷⁰ cf. Rapport du groupe de travail sur la stratégie nationale en toxicologie et écotoxicologie

⁷¹ Initiative française pour la recherche en environnement santé

Cet objectif est maintenant à portée avec les développements récents dans le domaine de la recherche et les réflexions au sein des Alliances et de leurs membres qui définissent des stratégies, de sorte que la question des 3R n'est plus centrée uniquement sur le domaine réglementaire. En contrepartie l'effort de mise en commun est plus complexe.

Définir des politiques par domaine et évaluer leur avancement

14. Cibler et construire des politiques sectorielles en fonction du potentiel de réduction

Des plans d'action peuvent être envisagés par domaine (réglementaire, contrôle, développement en médecine, recherche, enseignement etc.). Les utilisateurs de l'expérimentation ont commencé à définir des stratégies propres à leur activité comme l'a fait l'INSERM dans le cadre de son plan stratégique, alors que la logique est très différente de celle, par exemple, du contrôle.

Propositions

- Préciser les domaines d'activité en cohérence avec la dynamique des acteurs et le système statistique sur les recensements d'animaux utilisés.
- Définir des stratégies sur l'évolution de l'emploi des différents modèles dans chaque domaine, avec des objectifs affichés.

Une impulsion nationale est souhaitable. Les acteurs principaux devront poursuivre leur effort de positionnement. FRANCOPA pourra contribuer avec les GT de ses experts aux conditions d'emploi des différents modèles.

15. Construire une nomenclature des méthodes alternatives pour permettre leur recensement.

En dépit de la difficulté majeure constituée par le fait qu'une grande partie des méthodes qui ont un potentiel 3R n'a pas été, à l'origine, conçue et développée dans cette logique un recensement est indispensable pour pouvoir décrire et défendre une politique nationale dans le domaine. Il ne pourra y avoir de soutien institutionnel sans visibilité sur ce domaine. L'absence de nomenclature empêche non seulement de comptabiliser les méthodes mais aussi de les identifier.

Des définitions partagées aux niveaux nationaux et internationaux doivent permettre de repérer les méthodes alternatives, quelles que soient leur place dans les 3R et y compris dans la recherche et l'enseignement. Peu de travaux ont eu lieu sur le sujet, bien que certains pays présentent des « bilans 3R ».

Propositions

- Etablir un schéma au niveau national
- Recenser les efforts dans le domaine et les méthodes disponibles
- Utiliser ces informations pour cibler des Appels à Proposition de Recherche.

➤ *FRANCOPA pourra jouer un rôle de concertation avec les acteurs français de la recherche et du développement qui s'investissent sur le sujet. Il fédérera les partenaires d'ECOPA pour consolider une position européenne, notamment avec la Wallonie.*

16. Connaître de façon détaillée les utilisations de l'expérimentation animale afin d'identifier des cibles pour l'application des 3R

Il avait été recommandé que l'enquête sur les pratiques expérimentales et usages des animaux puisse être approfondie, et plus systématiquement exploitée. Les dernières années ont vu une amélioration de l'exhaustivité de la procédure de recensement. Il reste que les modèles animaux ne sont pas immuables et que leurs choix et leurs applications évoluent (cf. l'utilisation croissante de poisson zèbre pour la toxicologie humaine) de sorte qu'il faut comprendre les raisons et le contexte d'évolution avant d'identifier des sujets que l'on pourrait se fixer.

Proposition

- Compléter les statistiques nationales par des analyses ou enquêtes détaillées auprès d'utilisateurs de l'expérimentation animale.

➤ *FRANCOPA pourrait appuyer le Ministère en charge de la recherche pour ce travail.*

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce rapport réactualisé constitue une première étape d'analyse sur les méthodes alternatives et l'application de la règle des 3R, en particulier en France. FRANCOPA s'est réjoui de la participation active des acteurs impliqués et notamment de la mobilisation d'instituts de recherche, d'EPIC et d'agences.

Le sujet ne saurait pour autant être clos, car de nombreux points n'ont pas été abordés. Le rapport ne traite pas au fond de la pertinence de telle ou telle méthode, étude laissée aux futurs centres envisagés en Europe. Autre faiblesse, FRANCOPA n'a pas pu avancer sa réflexion au point de donner des horizons temporels pour la mise au point des différentes méthodes, alors que ceux-ci peuvent aller de quelques années à des décennies selon les sujets. L'intérêt suscité par le sujet auprès des scientifiques rencontrés, qui fait suite au succès de la mise en place de FRANCOPA, montre une réelle mobilisation qui vient certainement d'une montée des préoccupations éthiques sur l'expérimentation animale au sein de la communauté scientifique. Elle vient aussi du fait que le développement de ces méthodes s'appuie et suscite des avancées importantes dans la compréhension des mécanismes du vivant, avancées elles-mêmes rendues possibles par les nouveaux outils d'investigation disponibles aujourd'hui.

La présente analyse montre en effet à quel point le développement des méthodes s'intègre dans le développement des connaissances sur le vivant. En particulier dans le domaine de la toxicologie, les méthodes alternatives génèrent des impératifs de développement de connaissance, et elles constituent ainsi un moteur important pour dynamiser les recherches dans ce domaine. Parallèlement, le développement de connaissances qu'il s'agisse d'outils d'investigation ou de la compréhension de mécanismes, ouvre la voie à des nouvelles méthodes. Les préoccupations entrent donc en synergie de façon remarquable avec la démarche de structuration de la toxicologie et de l'écotoxicologie. Par exemple, quand il s'agit de passer d'une liste à priori d'essais opposables à une confirmation des modes d'action supposés grâce à des expérimentations ciblées (stratégies de test intégrés).

Cette même synergie s'observe avec la dynamique mise en place dans le domaine des sciences de la santé.

Ainsi, on ne saurait plus aujourd'hui considérer le développement de ces méthodes comme une démarche isolée du reste de la démarche de développement des connaissances, qu'il s'agisse de toxicologie, de biologie, de thérapie.

FRANCOPA entend accompagner cette démarche globale et œuvrer à approfondir cette interaction entre développement scientifique et applications en termes de méthodes alternatives, et à faciliter le passage des développements amont aux applications. Toutefois, FRANCOPA, dans l'esprit des plateformes rassemblées dans ECOPA n'est pas uniquement un lieu d'échange scientifique. Il se doit de rappeler que l'alternative en expérimentation animale ne relève pas uniquement de percées scientifiques, mais que la généralisation des bonnes pratiques, la circulation de l'information et la recevabilité sociétale ont aussi leur part.

Il entend dans l'avenir s'associer aux moyens qui seront mis en place pour assurer le suivi de la mise en œuvre des méthodes et des recommandations émises.

Bien évidemment, après avoir souligné les limites du travail effectué et avoir fourni des éléments pour son amélioration, FRANCOPA juge souhaitable d'actualiser le bilan réalisé de façon régulière et de faire connaître ce rapport auprès des parties prenantes.

LES ANNEXES

- 1. LES CADRES LEGISLATIFS ET REGLEMENTAIRES
DES METHODES ALTERNATIVES EN EXPERIMENTATION ANIMALE**
 - La réglementation nationale selon la Directive 2010/63/UE
 - La réglementation européenne selon la Directive 2010/63/UE

- 2. LE PROGRAMME DETAILLEE INRS**

- 3. LE PROGRAMME DETAILLEE ANSES**

- 4. LES PROGRAMMES EUROPÉENS ET INTERNATIONAUX
DÉDIÉS AUX MÉTHODES ALTERNATIVES**

- 5. LISTE DES CENTRES 3R**

- 6. LE GLOSSAIRE**

ANNEXE 1 - LES CADRES LEGISLATIFS ET REGLEMENTAIRES DES METHODES ALTERNATIVES EN EXPERIMENTATION ANIMALE

LA REGLEMENTATION NATIONALE SELON LA DIRECTIVE 2010/63/UE

La réglementation en vigueur en France (articles R214-87 à R214-137 du Code rural) a été mise à jour par le décret 2013-188 et cinq arrêtés datés du 1er février 2014 et publiés le 7 février 2014, en application de la directive 2010/63/UE. Cette réglementation est sous la responsabilité du ministère de l'Agriculture. Elle établit les règles qui suivent.

Espèces animales concernées - La réglementation protège les animaux vertébrés, y compris les formes larvaires autonomes ou fœtales évoluées, et les céphalopodes. Cela signifie qu'elle s'applique par exemple aux poissons, aux oiseaux et aux mammifères mais pas aux insectes. L'utilisation de primates (comme les macaques) est restreinte. L'utilisation de grands singes (comme le chimpanzé) est interdite et ne pourrait être autorisée que dans des cas d'extrême nécessité sanitaire. Il faut savoir que cela fait des années que les grands singes ne sont plus utilisés en Europe.

Origine des animaux - les animaux doivent provenir d'élevages ou de fournisseurs agréés. A terme les primates ne pourront provenir que d'élevages sans apport d'effectifs extérieurs. Les animaux d'espèces domestiques errants ne peuvent pas être utilisés sauf exigence sanitaire particulière et sur dérogation.

Licéité - Une expérience sur animaux n'est licite que si elle est nécessaire et irremplaçable et que si elle relève de la recherche en santé humaine ou animale, de la protection de l'environnement ou de l'enseignement supérieur ou professionnel ou d'enquêtes médico-légales. Les principes de remplacement (par une méthode ne nécessitant pas d'animaux), de réduction (par la diminution du nombre d'animaux au strict minimum) et de raffinement (par le choix des méthodes les plus douces) doivent être respectés.

Douleur - Les expériences douloureuses doivent être pratiquées sous anesthésie sauf dérogation documentée. La mort comme donnée d'observation de l'expérience, doit être évitée autant que possible.

Agrément des établissements - Tout établissement éleveur, fournisseur ou utilisateur doit être agréé (conformité des installations et de la formation du personnel). L'agrément est accordé pour 6 ans. Un vétérinaire et une structure du bien-être des animaux doivent être désignés. Des inspections régulières sont réalisées.

Evaluation éthique et autorisation des projets de recherche - Tout projet de recherche qui inclut le recours à l'expérimentation animale doit faire l'objet d'une évaluation éthique favorable délivrée par un comité d'éthique agréé. Il doit obtenir une autorisation délivrée par le ministère de la recherche.

Commission nationale - Une Commission nationale de l'expérimentation animale composée de 20 membres (ministères, recherche publique et privée, associations de protection animale, professionnels de la recherche) donne des avis et fait des propositions.

Comité national - un Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale établit le bilan annuel national d'activité des comités d'éthique et formule des recommandations. Il est composé de 14 membres (ministères, professionnels, médecin, vétérinaire, philosophe, juriste, sociologue, associations de protection animale).

LA REGLEMENTATION EUROPEENNE SELON LA DIRECTIVE 2010/63/UE

La directive européenne 2010/63 définit les conditions dans lesquelles l'expérimentation animale peut être pratiquée dans l'Union européenne.

Espèces animales - Les animaux vertébrés, leurs formes larvaires ou embryonnaires évoluées et les céphalopodes sont concernés par la directive, qu'ils soient destinés aux études *in vivo* (utilisation d'animaux vivants) ou *in vitro* (utilisation d'organes ou de tissus).

3R - Le principe des 3R (remplacement, réduction, amélioration) doit être appliqué.

Licéité - Les domaines scientifiques admis sont la recherche fondamentale, la santé des hommes, des animaux et des plantes, la recherche agronomique, la protection de l'environnement, la conservation des espèces, l'enseignement supérieur ou technique, les enquêtes médico-légales.

Gravité - Les procédures sont classées sur une échelle de gravité (annexe VIII).

Agrément - Les établissements d'expérimentation et les établissements éleveurs doivent être agréés et enregistrés (conformité des installations cf. annexe III, conformité de la formation du personnel cf. annexe V, existence d'une structure chargée du bien-être des animaux).

Evaluation et autorisation - Chaque projet d'étude doit avoir reçu une évaluation favorable (intérêt scientifique ou éducatif, conformité au principe des 3R, évaluation de la gravité, considérations éthiques, intérêt d'une évaluation rétrospective) et une autorisation préalable.

Résumé non technique - Un résumé non-technique des projets autorisés doit être publié.

Méthodes alternatives - les Etats membres doivent encourager les méthodes alternatives (remplacement, réduction, amélioration).

L'expérimentation animale est encadrée en Europe par une Convention européenne de 1986 (STE 123) et par la Directive du Conseil et de la Commission du Parlement européen N°86/609.

Cette Directive, basée sur le concept des 3R (remplacer, réduire et raffiner) régit 4 grands paramètres de l'expérimentation animale sur les vertébrés :

- Le type d'expériences réalisées,
- Les expérimentateurs,
- Les établissements d'élevage et d'expérimentation,
- Les animaux utilisés, leurs conditions d'hébergement et de soins.

L'article 7 de la Directive reprend le principe des 3R :

Le paragraphe 2 précise qu'« il ne sera pas effectué d'expérience s'il existe une possibilité raisonnable et pratique d'avoir recours à une méthode scientifiquement acceptable et n'impliquant pas l'utilisation d'un animal pour obtenir le résultat recherché » (Remplacer).

Le paragraphe 3 indique que « le choix des expériences sera guidé par le souci de sélectionner celles qui utilisent le nombre minimal d'animaux et les animaux les moins sensibles du point de vue neurophysiologique, qui causent le moins de douleur, de souffrance, d'anxiété et de dommages durables et pour lesquelles il y a le plus de chances d'obtenir des résultats satisfaisants » (Réduire et Raffiner).

L'article 23, paragraphe 1 souligne la **responsabilité de la Commission et de ses Etats membres** dans l'encouragement des recherches de méthodes alternatives.

La transposition de cette Directive en droit français a donné lieu à plusieurs décrets et arrêtés permettant de réglementer les pratiques en expérimentation animale, et où l'on retrouve ce principe des 3R : le décret N°87-848 du 18 octobre 1987, modifié par le décret N°2001-464 du 29 mai 2001, ultérieurement codifiés dans les articles R214-87 à R214-122 du Code rural, les arrêtés du 19 avril 1988, le décret 2001-466 du 6 juin 2001 portant publication de la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques.

Il est à noter aussi une référence au principe des 3R dans la partie législative du Code rural, article L214-3, établissant qu'il est interdit d'exercer des mauvais traitements aux animaux tenus en captivité, des décrets en Conseil d'Etat déterminant les mesures propres à assurer la protection de ces animaux, y compris pour les animaux de laboratoire, sachant que les expériences biologiques médicales et scientifiques doivent être limitées aux cas de stricte nécessité. Le non-respect d'une prescription de cet article conduit aux sanctions décrites dans les articles L215-6 et 7.

La Directive 86/609 a été remplacée par la Directive 2010/63/UE en date du 22 septembre 2010. Cette Directive est en cours de transcription en droit français, et elle entrera en vigueur le 1^{er} janvier 2013, afin de prendre en compte les dernières avancées scientifiques et les nouvelles connaissances en matière de bien-être animal. L'évolution porte sur 3 points principaux

- Le renforcement de l'éthique pour limiter la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux,
- La définition des animaux concernée est étendue notamment aux formes larvaires autonomes, aux formes fœtales de mammifères à partir du dernier tiers de leur développement normal et aux céphalopodes vivants,
- Le renforcement de la dynamique du développement des méthodes alternatives avec un point d'entrée pour chaque pays et la création d'un laboratoire européen de référence basé au centre commun de recherches à Ispra.

ANNEXE 2

L'INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE ET DE SÉCURITÉ POUR LA PREVENTION DES ACCIDENTS DU TRAVAIL ET DES MALADIES PROFESSIONNELLES

PROGRAMME DÉTAILLÉ DE L'INRS

Stéphane Binet, Alain Simonnard – 09 septembre 2014

Actions de l'Institut National de Recherche et de Sécurité en faveur du développement et de l'usage de méthodes alternatives à l'expérimentation animale

L'objectif essentiel des programmes de recherche toxicologique de l'INRS consiste à prévenir les atteintes pour la santé qui résultent de l'exposition aux agents chimiques présents sur les lieux de travail. Impliqué dans des activités d'études et de recherche en toxicologie industrielle, le département Toxicologie et Biométrie de l'INRS participe à l'évaluation du risque chimique en milieu professionnel. Il apporte des connaissances mises à disposition de la communauté scientifique et des instances réglementaire, nationales et internationales. Les activités de recherche sont menées dans le département ou en partenariat avec d'autres départements de l'INRS ou encore avec des équipes externes à l'INRS en utilisant des méthodes alternatives ou en contribuant à leur mise au point dans les domaines de la cancérogénèse, de la mutagénèse, de l'immunotoxicité et du passage percutané.

Le laboratoire « Pénétration Cutanée, Cinétique et Métabolisme » s'intéresse à la voie cutanée, seconde voie d'exposition professionnelle aux agents chimiques. Pour certaines molécules le passage percutané est prépondérant. Ainsi, les valeurs limites d'exposition professionnelles atmosphériques peuvent porter la mention "peau" dès lors que la contribution de la voie cutanée est susceptible de contribuer pour au moins 10% de l'absorption totale par l'organisme et entraîne un effet systémique. L'estimation aussi précise que possible du passage percutané constitue donc un élément essentiel dans l'évaluation des risques professionnels et par conséquent dans la protection des salariés au poste de travail. Nos objectifs sont d'apporter une meilleure connaissance des risques liés à une exposition cutanée, à développer des indicateurs de toxicité cutanée et à modéliser l'absorption percutanée des toxiques industriels. Depuis le 1er juin 2007, le règlement REACH (Registration, Evaluation and Autorisation of Chemicals) est entré en vigueur. Au regard du grand nombre de molécules à étudier, il est difficilement envisageable de systématiquement mettre en œuvre des méthodes expérimentales *in vivo* pour déterminer le flux de passage percutané : les méthodes *in vivo* sont coûteuses en animaux, en réactifs et en temps. Nous travaillons donc sur des méthodes *in vivo* ou *ex vivo* chez le rat ou l'Homme pour estimer le flux d'absorption de toxiques industriels : l'intérêt des méthodes *ex vivo* est de réduire notablement le nombre d'animaux.

Une de nos études devrait permettre de définir des conditions expérimentales optimales pour mieux évaluer le risque lié à une exposition par voie cutanée à des substances chimiques lipophiles solides. Ces composés, solides à température ambiante, sont classiquement solubilisés dans un solvant (acétone, éthanol) pour permettre un dépôt homogène sur la peau. Après évaporation du solvant et pour plusieurs produits que nous

avons testés, nous n'observons pas de flux d'absorption percutanée stable malgré des quantités importantes déposées sur la peau. Dans tous les cas, l'évolution du flux d'absorption percutanée en fonction du temps d'exposition passe par un maximum puis décroît. Ainsi, il est difficile de connaître le flux d'absorption exact de ces molécules. Des travaux récents décrivent des matrices sous forme de sébum artificiel qui se rapprochent des conditions *in vivo* : nous en testerons l'intérêt afin de déterminer le flux d'absorption de produits lipophiles solides.

Nous travaillons aussi sur l'influence de différents paramètres impliqués dans l'absorption cutanée et sur la normalisation du flux d'absorption en fonction de la structure de la peau. Des résultats expérimentaux obtenus *ex vivo* chez le rat et l'homme ont montré que, pour des conditions d'exposition a priori identiques, le flux d'absorption percutanée mesuré pouvait fluctuer de manière importante (d'un facteur 10 chez l'homme). Lorsque le flux de ces mêmes molécules est déterminé *in vitro* sur des membranes artificielles en silicone, les valeurs obtenues sont très reproductibles. Il existe donc un ou des facteurs inhérents aux échantillons eux-mêmes ou à leur préparation qui influencent le flux d'absorption. Au cours de cette étude, nous proposons de corrélérer le flux de passage percutané avec les caractéristiques de la peau déterminées à partir de coupes histologiques, et notamment l'épaisseur des différentes couches cutanées (*stratum corneum*, épiderme viable et derme). Ceci devrait permettre de réduire la variabilité observée dans la mesure du flux de certaines molécules et de donner ainsi une meilleure estimation des flux d'absorption mesurés *ex vivo*.

Enfin, un de nos axes de recherche concerne les relations structure-activité permettant d'estimer le flux d'absorption de nombreuses molécules à partir de leur masse moléculaire et de leur affinité relative pour des milieux aqueux et lipidiques. Cependant, ces modèles présentent des limites. En particulier, ils ne prennent pas en compte l'activité métabolique de la peau qui peut avoir une influence sur l'absorption percutanée de certains agents chimiques. Nous avons ainsi montré que les fortes variations des flux d'absorption d'un phtalate entre des échantillons de peau de différentes espèces étalent dues à leur différence d'activité métabolique. De même, récemment, nous avons pu établir une relation structure activité simple pour les herbicides de la famille de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique. Une partie de nos études futures auront pour objectif de développer des relations structure/activité pour réduire le nombre d'expérimentations animales en s'appuyant sur des méthodes *in silico* validées.

Le laboratoire « Sensibilisations, Allergies et Biologie Clinique » mène des travaux sur l'allergie aux produits chimiques utilisés dans l'industrie. Provoquées par l'exposition des salariés aux substances chimiques, les allergies sont un problème important de santé au travail : elles concernent un grand nombre de professions et de secteurs d'activité. En plus des substances existantes, chaque année de nouvelles substances apparaissent dans le domaine industriel pour lesquelles il est impératif d'identifier précocement les éventuelles propriétés sensibilisantes. Actuellement, plus de 350 substances industrielles ont été identifiées comme allergènes professionnels. Le développement de tests d'identification du pouvoir sensibilisant de produits industriels répond non seulement aux nouvelles directives européennes mais est également essentiel pour la prévention des allergies professionnelles. De plus, la Directive n° 2010/63/UE et le système REACH incitent à limiter l'utilisation d'animaux de laboratoire pour l'évaluation des substances chimiques. Il y a donc un besoin important de développer des tests *in vitro* alternatifs aux tests *in vivo* existants pour évaluer le pouvoir sensibilisant de ces produits.

Une étude antérieure nous a permis de travailler sur un test *in vitro* de prédiction du potentiel sensibilisant de produits chimiques en utilisant un modèle cellulaire. Pour cela, des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris ont été exposées à 20 substances chimiques de référence : 16 sensibilisants et 4 non sensibilisants. L'activation des cellules a été évaluée par la mesure de l'augmentation de l'expression de marqueurs membranaires ainsi que par l'augmentation de la production de cytokines. Les résultats ont

été comparés au test LLNA, test de référence et réglementaire pour l'étude de l'effet sensibilisant. Ils montrent que les irritants et les non sensibilisants testés n'activent pas les cellules étudiées. Parmi les 16 sensibilisants étudiés, 8 sensibilisants cutanés sur 9 testés sont identifiés et 3 sensibilisants respiratoires sur 7 testés induisent une forte activation cellulaire. Cette étude a permis de montrer que le modèle basé sur des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris présente un réel intérêt pour la recherche d'un test de substitution au modèle *in vivo* pour l'évaluation du pouvoir sensibilisant. Il permet de discriminer les sensibilisants des non sensibilisants et de classer les sensibilisants cutanés selon leur potentiel sensibilisant. Néanmoins, ce modèle ne permet pas de distinguer un sensibilisant cutané d'un sensibilisant respiratoire. Il avait été conclu que le développement de nouveaux modèles de co-culture entre différents types cellulaires pourrait peut-être répondre à cet objectif.

C'est ainsi qu'actuellement nous travaillons sur une méthode *in vitro* de co-culture entre des cellules épithéliales et des cellules dendritiques de souris afin de détecter les sensibilisants cutanés et respiratoires. Actuellement, peu d'études s'intéressent à cette dernière catégorie et la mise au point d'un test *in vitro* permettant de les discriminer répondrait aux attentes des nouvelles directives européennes notamment dans le cadre du règlement CLP (Classification, Labelling, Packaging) relatif à la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances chimiques. Les résultats permettront d'évaluer l'intérêt de ce modèle *in vitro* pour l'identification d'allergènes chimiques et pourraient conduire dans le futur, après comparaisons inter-laboratoires, à un test stabilisé et validé.

Le laboratoire de « Cancérogénèse, Mutagenèse et Reprotoxicité » réalise des études orientées sur la détection des effets mutagènes ou cancérogènes et sur des indicateurs d'effets précoces en toxicologie de la reproduction *in vivo*. Des tests *in vitro* permettent de prévoir et d'étudier les effets mutagènes et cancérogènes potentiels des substances toxiques et de rechercher les mécanismes d'action par lesquels ces agents chimiques interviennent dans le processus de cancérogénèse. L'identification des expositions aux substances susceptibles d'avoir des effets délétères sur la grossesse est indispensable à l'établissement de règles protégeant les salariées enceintes. Dans ce but, des études de la toxicité sur le développement prénatal de produits chimiques industriels sont menées chez le rongeur :

- En cancérogénèse et mutagenèse (fibres et particules micro- ou nano-structurées) :
In vitro, nous utilisons des méthodes d'investigation réglementaires ou non (cytotoxicité, apoptose, test des micronoyaux, test des comètes, recherche de stress oxydant transformation cellulaire, etc.). Des recherches sont aussi actuellement réalisées sur les essais de transformation cellulaire qui sont les seuls essais *in vitro* capables d'identifier des agents cancérogènes ne possédant pas de propriétés génotoxiques ou mutagènes. Ceci dans l'optique de limiter le nombre d'essais de cancérogénèse *in vivo* qui requièrent un grand nombre d'animaux.
In vivo, nous réduisons le nombre d'animaux en maximalisant le nombre d'investigations par animal : réponse inflammatoire pulmonaire (lavage broncho-alvéolaire), prolifération et mort cellulaire (immunohistochimie), expression de cytokines pro-inflammatoires, marqueurs de stress oxydant, génotoxicité (tests des comètes et des micronoyaux dans différents organes cibles), expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et le stress oxydant par RT-PCR quantitative, etc.
- En reprotoxicité (pesticides et perturbateurs endocriniens) : l'objectif est de déterminer si ces substances peuvent interférer sur la production de testostérone au niveau de l'appareil reproducteur mâle en développement, en utilisant des marqueurs spécifiques et précoces généralement plus sensibles que les méthodes d'évaluation

traditionnelles utilisées en toxicologie de la reproduction. Ces approches permettent notamment de limiter le nombre important d'animaux qui devrait être utilisé en toxicologie conventionnelle pour évaluer notamment les effets des « faibles doses ».

L'INRS participe au projet européen « NanoReg » (2013-2016) dont les trois principaux objectifs sont :

- Fournir aux législateurs des pays partenaires un ensemble d'outils d'évaluation de risques à court et moyen terme ;
- Développer à long terme de nouvelles stratégies de tests adaptés aux exigences d'innovation dans lesquelles beaucoup de facteurs peuvent impacter l'environnement et la santé ;
- Établir une étroite collaboration entre les autorités et l'industrie en ce qui concerne la connaissance exigée pour la gestion des risques (création de bonnes pratiques de gestion des risques).

Enfin, l'INRS soumet ses protocoles expérimentaux au Comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale Nancy-Lorraine-Nord-Est (CELMEA). Les travaux des Comités d'éthique s'assurent notamment de la bonne application de la règle des 3R par les expérimentateurs. Elaborée en 1959, cette règle constitue le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en Europe et en Amérique du Nord : « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation, « Raffiner » la méthodologie utilisée ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption de l'expérimentation) et « Remplacer » les modèles animaux.

ANNEXE 3

L'ANSES : L'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

PROGRAMME DETAILLE DE L'ANSES

Les missions de l'Anses, fixées par l'ordonnance n°2010-18 du 7 janvier 2012, couvrent l'évaluation des risques dans le domaine de l'alimentation, de l'environnement et du travail, en vue d'éclairer les pouvoirs publics dans leur politique sanitaire. L'Anses est un établissement public administratif, placée sous la tutelle des ministères de la Santé, de l'Agriculture, de l'Environnement, du Travail et de la Consommation.

Dans cet objectif elle assure l'évaluation des risques sanitaires pour l'Homme, les animaux et les écosystèmes (faune et flore sauvages et milieux, dans le cadre de l'évaluation des produits phytopharmaceutiques et biocides) liés aux aliments et à des produits entrant dans la chaîne de production alimentaire, qu'ils soient susceptibles d'être introduits volontairement (additifs, auxiliaires technologiques, médicaments vétérinaires) ou non (bactéries, virus, résidus de contaminants chimiques, etc.). Elle assure également le contrôle et le développement du dispositif national de détection et de mesure des dangers biologiques et chimiques dans les aliments et chez les animaux, par l'activité de référence de ses laboratoires. L'Agence conduit également des études et recherches permettant de caractériser les contaminants, leurs effets, leur diffusion et leur action et de développer des outils de prévention des maladies. En raison d'exigences scientifiques ou réglementaires, l'Anses doit appuyer ses avis et travaux sur des expérimentations animales. Néanmoins, cette nécessité est systématiquement pesée au regard du souci de l'Agence d'assurer la protection des animaux, qui sont des êtres vivants et sensibles, etc. Les laboratoires de l'Anses mènent leurs travaux en ayant recours à l'expérimentation animale que lorsqu'aucune autre alternative n'est envisageable. En outre, ils participent eux-mêmes au développement de méthodes alternatives à cette expérimentation. Cette politique vise à réduire autant que faire se peut l'expérimentation animale en considérant les limites de toute extrapolation de démarches de l'ex vivo à l'in vivo. Par ailleurs, afin d'assurer l'évaluation de ces projets ayant recours à l'expérimentation animale l'Anses dispose d'un comité d'éthique en expérimentation animale commun à l'Agence, l'école vétérinaire d'Alfort et l'université Paris-Est Créteil Val-de-Marne. Ce comité est composé de scientifiques, techniciens animaliers et vétérinaires des 3 organismes veillant à ce que les projets utilisant des animaux soient justifiés du point de vue scientifique, que les objectifs de ces projets justifient l'utilisation des animaux et que le déroulement des procédures du projet se fasse dans les conditions les plus respectueuses pour l'animal. En outre, conformément au décret n°2013-118 du 1er février 2013, l'Anses dispose dans chacun de ses laboratoires de responsables du bien-être des animaux et de structures « bien-être » composées de personnels ayant les compétences nécessaires pour apprécier les conditions d'expérimentation, garantir au mieux le bien-être des animaux en limitant au maximum le nombre d'animaux utilisés lors des expérimentations indispensables et veillent au bon déroulement des projets ayant recours aux animaux.

Dans le cadre de l'audition de l'Anses par l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques sur les « principes applicables en Europe à l'expérimentation

animale et les méthodes alternatives à celle-ci », l'Agence a recensé ses actions et fait le point sur sa situation actuelle et les perspectives d'évolution dans ce domaine.

1. Les approches utilisées pour les études *in vivo* conduites par l'Agence

Les études de génotoxicité *in vivo* sont réalisées tout en limitant le nombre d'animaux de diverses façons :

- Quand cela est possible, les tests sont effectués conjointement sur les mêmes animaux (par ex : test des comètes et test du micronoyau).
- Plusieurs organes sont prélevés sur chacun des animaux des études.
- Plusieurs produits sont testés en même temps d'où un seul lot de témoins négatifs et de témoins positifs, lorsque cela n'interfère pas sur la qualité des résultats de l'expérimentation.
- Les témoins positifs ne sont réalisés que lorsqu'ils sont nécessaires (dans certains cas les lames positives d'une étude précédente sont utilisées et codées au moment de la lecture des lames).

L'Anses dispose d'installations expérimentales de haut niveau de biosécurité (conventionnel, A2, A3) garantissant les meilleures conditions d'hébergement possibles des animaux.

2. Le développement par l'Agence d'études *in vitro*

- Concernant la réglementation des biotoxines marines, l'Agence a participé et participe encore activement au processus de validation communautaire des méthodes d'analyse physico-chimique permettant la détection et le dosage des biotoxines réglementées. Elle conduit également des travaux de recherche sur des tests cellulaires pour la détection d'autres composés toxiques (y compris toxines nouvelles ou émergentes) dans les aliments lorsque les besoins le nécessitent.
- L'Agence participe à caractériser les capacités de réponse de différents modèles cellulaires humains hépatiques (cellules Hepa-RG) ou intestinaux (cellules Caco2, HT29-MTX, HIEC) pour mieux prédire la toxicité chez l'homme. Ainsi, le modèle hépatique HepaRG, contrairement aux modèles utilisés actuellement qui sont dépourvus d'enzymes de métabolisation et qui nécessitent l'ajout d'extraits de foie de rat, système métabolique assez éloigné du métabolisme humain, constitue une bonne alternative pour rechercher les effets hépatiques engendrés par les composés et leur(s) métabolite(s). Des nouveaux modèles cellulaires intestinaux isolés d'embryons humains (HIEC) sont également prometteurs pour étudier les effets au niveau de l'épithélium intestinal. Enfin, des études de toxicocinétique *in vitro* de la barrière intestinale (cellules Caco2 éventuellement en co-culture avec d'autres cellules) sont utilisées et développées pour apporter des connaissances sur les mécanismes mis en jeu lors du passage de cette barrière par divers composés. Ces études ont pour but de fournir des données pour la réalisation de modèles *in silico* qui pourront permettre d'appréhender les effets *in vivo* tout en limitant l'expérimentation animale.
- En matière d'influenza aviaire, la caractérisation des niveaux de pathogénicité des virus influenza (et maladie de Newcastle) étaient conduits jusque très récemment par inoculation d'animaux dans les épreuves dites « ipic et ipiv » soit indices de pathogénicité par voie intracérébrale ou intraveineuse. Ces essais restent les épreuves de références pour la déclaration de la pathogénicité des virus à l'OIE mais l'Anses a développé des méthodes de séquençage qui permettent de déterminer plus rapidement et sans utiliser de modèles animaux le caractère hautement pathogène ou faiblement pathogène d'un virus. La mise en évidence d'agents pathogènes chez les poissons fait également l'objet de développement de méthodes alternatives visant à

réduire les tests sur poissons, notamment le développement de lignées cellulaires à partir de cellules épithéliales de branchies de saumon, de gonades d'esturgeons ou de peau de carpe. La mise au point de ces lignées permet de réaliser des tests visant à identifier les pathogènes responsables de maladies observées en milieux naturels et de faciliter leurs immunodétections ultérieurement. L'Anses dispose d'un laboratoire de référence sur la thématique.

- D'une manière générale, le développement par les laboratoires Anses de diagnostic par PCR de nombreuses maladies animales évite dans de nombreux cas le recours à l'expérimentation animale sur ces espèces cibles. De plus, quand ces PCR se substituent à des tests ELISA, elles permettent d'éviter la préparation des sérums de référence sur lapins ou tout au moins de diminuer leur fréquence. De même, l'utilisation de méthodes de typage moléculaire en lieu et place des méthodes de sérotypage évite la préparation des sérums de sérotypage sur lapins par exemple. Par exemple, le développement par l'Agence de techniques complètes de typage des types toxiques de *Clostridium botulinum* par PCR devrait permettre à terme d'éviter de nombreux essais sur souris. De même, le criblage de substances bioactives susceptibles d'inhiber le portage asymptomatique de *Campylobacter* et *Salmonella* chez les volailles est systématiquement effectué *in vitro* à l'aide de technique de microtitration avant le passage des molécules ainsi sélectionnées sur modèles animaux.
- Dans le cadre de travaux relatifs à l'étude de l'impact de molécules chimiques sur la maladie de Parkinson, des essais sont conduits dans le but d'identifier et de quantifier les altérations de protéines neuronales tels que l'alpha-synucléine jouant un rôle crucial dans cette maladie neurodégénérative humaine. L'alpha-synucléine est une protéine présentant une très grande similitude de séquences entre l'homme et le rongeur. Toutefois, un des objectifs de l'Anses a consisté à développer des modèles cellulaires notamment pour pallier aux limites des modèles expérimentaux de rongeurs conventionnels, qui n'offrent qu'une reproduction partielle des éléments caractérisant la pathologie humaine, et qui supposent une durée expérimentale longue du fait d'un processus pathologique progressif, apparaissant au cours du vieillissement. Ainsi ces approches *in vitro* permettent de sélectionner des molécules au potentiel neurotoxique et contribuent à la réduction du nombre d'expérimentations sur le rongeur limitées aux molécules ciblées. Plusieurs modèles cellulaires ont été mis en place pour contribuer à l'évaluation de la neurotoxicité de substances chimiques objectivée par l'altération de l'expression normale de l'alpha-synucléine. Il s'agit essentiellement d'une lignée humaine de neuroblastome. Ces cellules neuronales cancéreuses d'origine humaine sont des neurones dopaminergiques constituant un modèle de choix pour l'étude de la maladie de Parkinson. D'autres lignées cellulaires d'origine humaine telles que des mélanomes sains et malins de peau sont également utilisées dans le but d'éclairer les mécanismes sous-jacents à la survenue de la maladie de Parkinson. Ces modèles cellulaires peuvent être transformés par transfection stable ou par transduction transitoire à l'aide d'adénovirus recombinants afin de surexprimer la protéine d'intérêt sous différentes formes (allèles sauvages ou présentant des mutations (A30P et A53T) associés à des formes génétiques de maladie de Parkinson) et rendre d'autant plus sensibles ces modèles *in vitro*.
- De façon exploratoire les travaux mécanistiques en cours dans cette thématique s'orientent également vers l'utilisation d'autres organismes vivants ayant un taux de reproduction plus rapide que les rongeurs, à savoir la drosophile, bien connue sur le plan génétique. Le développement de ce modèle drosophile porteur de la mutation génique A53T présente dans la maladie de Parkinson, permet d'accéder à des informations utiles en termes d'impact phénotypique comme sur l'expression d'altérations motrices observées dans ces maladies, ce qui constitue un avantage

notable comparativement aux modèles *in vitro*. Pour être entièrement valide, cette approche nouvelle nécessite plusieurs phases de calibration pour en déterminer les avantages mais aussi les limites. En attendant, cette alternative devrait pouvoir réduire le nombre de rongeurs dans cette phase d'expérimentation chez l'animal, étape qui s'avère malgré tout incontournable au cours de la progression des connaissances scientifiques.

- Le développement de la plateforme « puces hautes densités » pour une application commune à l'ensemble des entités de l'Anses devrait permettre lors de l'étude de l'interaction Hôte Pathogène de diminuer le nombre d'animaux utilisés dans les expérimentations, voire dans certains cas de développer des modèles entièrement sur culture cellulaire. Ce type de modèle existe déjà pour des virus tels que le PCV2 (maladie d'amaigrissement du porcelet) ou la peste porcine classique. Des modèles de toxicologie utilisant les puces hautes densités sont actuellement en cours de développement. Même si l'on ne peut envisager que ces méthodes se substituent totalement aux essais sur animaux, notamment espèce cible, ils contribueront significativement à la réduction du nombre d'animaux utilisés dans les expérimentations.
- Le contrôle des vaccins antirabiques inactivés à usage vétérinaire s'est aussi adapté aux 3R. La détermination de l'activité d'un vaccin (exprimée en UI/dose) passe classiquement par un test d'épreuve sur souris vaccinées afin de déterminer une dose efficace (DE) protégeant 50% de l'effectif de souris. L'activité relative du vaccin à contrôler est déterminée par comparaison de sa DE50 avec celle d'un vaccin de référence de titre connu. Aujourd'hui, un test sérologique d'activité permet de réduire de 75% le nombre d'animaux utilisés pour le contrôle d'activité, et de s'affranchir de l'étape d'épreuve virulente intracérébrale. Ce test alternatif est désormais appliqué dans le cadre de la libération officielle de lot (OCABR).
- L'utilisation d'outils de simulation et de prédiction des étapes cinétiques (ADME pour Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination) et d'effet pharmacologique (ADMEP) et toxicologique (ADME-T) est importante comme alternative aux expérimentations animales à des fins de réduction des coûts associés aux expérimentations animales et pour répondre aux questions éthiques posées par les étapes de développement de nouvelles molécules pharmaceutiques et l'évaluation de risque des produits chimiques. Il est donc nécessaire de développer ces approches *in silico*, de s'assurer de leur exactitude et de développer les connaissances en chimie théorique, et en biologie fondamentale sous tendant ce domaine scientifique. Le recours à la modélisation mathématique pour l'évaluation ADME est très développé dans le domaine pharmaceutique notamment vétérinaire (problématique des résidus) avec de nombreux outils disponibles. L'Anses a développé des compétences dans l'utilisation de ces outils pour analyser les études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de médicaments vétérinaires notamment antibiotiques ainsi que leur application à l'étude des propriétés toxicocinétiques de contaminants. Le règlement REACH mentionne le recours aux techniques QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) pour la toxicologie prédictive et son utilisation dans l'analyse des 30 000 substances utilisées aujourd'hui. Les enjeux du développement des outils de modélisation ADME associés avec les techniques QSAR supposent la capacité de modéliser et de prédire les processus ADME, les effets pharmacodynamiques (vis-à-vis de récepteurs clés) et des processus toxiques qui peuvent eux-mêmes modifier les processus ADME. Le recours aux modélisations biocinétiques (ou PBPK pour Physiologically based pharmaco-kinetics) se développe dans le domaine pharmaceutique notamment dans la stratégie de « screening » des molécules. Les informations issues de ces simulations sont très utiles mais sont dépendantes des données d'entrée dans le modèle tant en description biologique des différentes

espèces animales que des paramètres physico-chimiques décrivant les molécules et les macromolécules responsables de leur biotransformation.

3. La place de l'expérimentation animale dans la constitution et l'évaluation des dossiers d'autorisation de mise sur le marché et l'évaluation des risques, alimentaires (dossiers évalués par l'Anses)

S'il est à noter le développement croissant de méthodologies *in vitro* et d'outils de modélisation, leurs applications pour l'évaluation de substances bien définies (chimiques ou biologiques) sont essentiellement ciblées sur des approches prédictives ou de « screening ».

L'évaluation de ces substances, lorsque leur mise sur le marché est encadrée par des dispositions réglementaires, est subordonnée à la mise en œuvre de batteries de tests toxicologiques et toxicocinétiques chez l'animal de laboratoire, validés selon des protocoles OCDE : toxicité aiguë, génotoxicité, toxicité subchronique, toxicité chronique, étude de cancérologie, toxicité de la reproduction et du développement, neurotoxicité, etc.

Ainsi peut être citée l'évaluation avant leur mise sur le marché des médicaments vétérinaires, des produits phytopharmaceutiques et produits biocides dont l'Anses a la responsabilité.

Pour les aliments, de nombreuses réglementations communautaires sectorielles prévoient des études toxicologiques chez l'animal pour l'évaluation avant autorisation. Entrent dans ce cadre :

- l'évaluation des additifs pour alimentation humaine,
- l'évaluation des nouveaux aliments pour alimentation humaine,
- l'évaluation des OGM,
- l'évaluation des enzymes pour alimentation humaine,
- l'évaluation des additifs pour alimentation animale,
- l'évaluation des matériaux au contact des aliments.

Enfin pour conduire ses évaluations de risques pour l'Homme liés à l'exposition par voie alimentaire aux résidus de contaminants de l'environnement, l'Anses doit disposer d'études de toxicologie expérimentale par voie orale, réalisées sur la substance incriminée, et complétées le cas échéant par des données d'épidémiologie humaine, pour définir des valeurs toxicologiques de référence.

Le Comité scientifique de l'AESA a souligné dans un avis récent l'importance du développement de méthodologies alternatives et recommandé l'instauration d'un dialogue entre la Commission et les instances d'évaluation sur les meilleures façons d'aborder l'introduction de nouvelles méthodes validées dans les lignes directrices existantes. Il conclut que si les études de toxicité aiguë et de génotoxicité peuvent en partie être réalisées par des tests *in vitro*, il est prématuré de pouvoir envisager à court terme la substitution par des études *in vitro* des autres études toxicologiques chez l'animal.

4. Les perspectives d'évolution de ces approches alternatives à l'expérimentation animale dans les prochaines années

Elles sont de plusieurs types :

- La construction de nouveaux modèles intégrant les données descriptives issues des modèles *in vitro*, de la chimie et de la biochimie structurale et de la modélisation des niveaux cellulaires, d'organes et organisme entier pour la prédiction d'effet (Structural Clinical Biology).

- La standardisation des approches *in silico* et la validation de leur capacité prédictive.
- Les modalités d'intégration de ces démarches dans les processus d'évaluation de risques (définition des incertitudes, responsabilité des modélisateurs) au niveau européen et international.
- La construction des bases de données et leurs accès dans un processus d'accroissement continu des connaissances.
- Le développement des compétences dans la communauté scientifique nationale (expertise), européenne et internationale et donc le développement de compétences internes pour suivre et accompagner ces évolutions.

5. Infectiologie : santé animale et sécurité des aliments

L'utilisation des modèles animaux est souvent essentielle à la compréhension des phénomènes de physiopathogénie en jeu au regard notamment des relations hôtes/pathogènes. L'approche expérimentale et, tout particulièrement, sur espèces cibles est la seule qui permette d'acquérir la connaissance nécessaire à l'amélioration de la sécurité sanitaire tant sur le plan de la santé animale que de la sécurité des aliments. Il n'est pas toujours possible de substituer cette approche par des techniques *in vitro*. Par ailleurs, le développement de ces modèles expérimentaux est indispensable aux premières étapes d'évaluation de l'efficacité de nouveaux vaccins ou de nouvelles molécules grâce notamment à la pharmacodynamique ; ce développement de modèles est indispensable à l'obtention de matériels biologiques de référence pour garantir la qualité des réactifs et outils de diagnostic ou de détection développés par un laboratoire de recherche ou un industriel. Toute limitation excessive de telles expérimentations animales aurait des conséquences désastreuses sur la santé des animaux d'élevages et, donc, sur la maîtrise de la sécurité sanitaire. En revanche, sur le plan général, des milliers d'animaux sont utilisés par les industriels, chaque année et à l'échelle européenne, pour le contrôle d'innocuité de chaque lot de produits biologiques avant commercialisation. Ces contrôles sont souvent réalisés sur un tout petit nombre d'animaux ôtant ainsi au test une réelle signification sur le plan statistique, alors même que les processus de fabrication des vaccins se sont considérablement améliorés et garantissent une bonne reproductibilité de la qualité des lots fabriqués. L'utilité de tels tests qui sont les plus gros consommateurs d'animaux est souvent sujette à caution.

ANNEXE 4

LES PROGRAMMES EUROPEENS

SEURAT-1: Towards the Replacement of *in vivo* Repeated Dose Systemic Toxicity Testing:

- ▶ **COACH: Coordination of Projects on New Approaches to Replace Current Repeated Dose Systemic Toxicity Testing of Cosmetics and Chemicals**
- ▶ **ToxBank: Supporting Integrated Data Analysis and Servicing of Alternative Testing Methods in Toxicology.**
- ▶ **SCR&Tox:** Stem Cells for Relevant, Efficient, Extended and Normalised Toxicology.
- ▶ **HeMiBio:** Hepatic Microfluidic Bioreactor.
- ▶ **DETECTIVE:** Detection of endpoints and biomarkers for repeated dose toxicity using *in vitro* systems.
- ▶ **COSMOS:** Integrated *In Silico* Models for the Prediction of Human Repeated Dose Toxicity of Cosmetics to Optimise Safety.
- ▶ **NOTOX:** Predicting Long-term Toxic Effects using Computer Models Based on Systems Characterisation of Organotypic Cultures.

IMI (Innovative Medicines Initiative): <http://www.imi.europa.eu/content/call-proposals>

LES PROGRAMMES INTERNATIONAUX

Tox21

ToxCast and Virtual Embryo : *In vitro* Data and *In Silico* Models for Predictive Toxicology

Unilever Safety & Environmental assurance Centre: Strategy for Testing Skin Sensitisation Potential Without Animals: Combining Different Methods Addressing the Adverse Outcome Pathway

Technical University of Berlin: Multi-Organ-Chips Developing a Human Chip-Based Platform for Repeated Dose Toxicity Testing

BASF Experimental Toxicology & Ecology: Applying the Skin Sensitisation Adverse Outcome Pathway to Risk Assessment

Exposome: *In vitro* Toxicology & Characterising the Exposome

OECD AOP Development programme: The Assessment & Use of Adverse Outcome Pathways by the OECD

OECD QSAR Toolbox

La boîte à outils QSAR est un logiciel gratuit destiné à être utilisé par les gouvernements, l'industrie chimique et d'autres parties prenantes afin de prédire le danger (éco)toxicologique sur la base d'analogies structurelles.

ANTARES

Liste de logiciels QSAR gratuits et commerciaux pour la prédiction de plusieurs propriétés physicochimiques et (éco)toxicologiques.

(<http://www.antares-life.eu/index.php?sec=modellist>).

Vega

Mise à disposition d'outils QSAR gratuits dont l'algorithme sous-jacent est rendu public (<http://www.vega-qsar.eu/>)

AXLR8

Accelerating the transition to a toxicity pathway-based paradigm for chemical safety assessment through internationally coordinated research and technology development

ANNEXE 5

LA LISTE DES CENTRES 3R

- ▶ **CAAT (USA)** : structure académique, créé en 1981

Budget : subventions de recherche, sponsoring et mécénat

Mission :

- Promote and support research in the development of *in vitro* and other alternative techniques.
- Serve as a forum to foster discussion among diverse groups leading to creative approaches to facilitate acceptance and implementation of alternatives.
- Provide reliable information on the science, philosophy, and public policy of alternatives to academia, government, industry and the general public.
- Educate and train in the application of alternatives.

- ▶ **3R RESEARCH FOUNDATION SWITZERLAND (Suisse)**, créé en 1987

A tripartite initiative between the public sector Parliamentary Group for Animal Experimentation Questions, the Foundation for Animal-Free Research, and the corporations Novartis Pharma, Hoffman-LaRoche, and Serono Ltd.

Budget: The funds used to support approved projects are provided in equal parts by the Federal Food Safety and Veterinary Office and Interpharma. An annual amount of approximately CHF 500,000 is available for grants.

Mission:

- The foundation acts primarily as a funding body for 3R research in Switzerland. Since its inception, the foundation has funded more than 100 research projects.
- In addition to direct funding, the foundation also publishes periodic 3R information bulletins and has developed an accredited 3R training course, which has become an integral element in animal user training and continuing education programs throughout Switzerland.

- ▶ **ZEBET (Allemagne)**, créé en 1989

Budget: BfR simultaneously funds approximately ten working groups with an average EUR 35,000 per year with project durations of one to three years in each case.

Mission: Centre for the Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments at BfR. (Bundesinstitut für Risikobewertung) i.e. portfolio of the Federal Ministry of Food and Agriculture

- ▶ **EURL-ECVAM (UE)**, créé en 2011, (ECVAM créé en 1991)
European Commission DG JRC, IHCP

Mission: The aim of EURL ECVAM (the European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing) is twofold:

- to promote the scientific and regulatory acceptance of non-animal tests which are of importance to biomedical sciences, through research, test development and validation and the establishment of a specialized database service to co-ordinate at the European level the independent evaluation of the relevance and reliability of

tests for specific purposes, so that chemicals and products of various kinds, including medicines, vaccines, medical devices, cosmetics, household products and agricultural products, can be manufactured, transported and used more economically and more safely, whilst the current reliance on animal test procedures is progressively

- EURL ECVAM is committed to support and serve:
 - the European Commission, and thereby the EU Member States;
 - the spirit and specific provisions of Directive 2010/EU/63;
 - the objectives of scientific validation and justifiable regulatory acceptance, and thereby the protection of man, animals and the environment.

▶ **ICCVAM (USA), créé en 1994**

The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) is a permanent committee of the NIEHS under the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods ([NICEATM](#)). ICCVAM is composed of representatives from 15 U.S. Federal regulatory and research agencies that require, use, generate or disseminate toxicological and safety testing information.

Mission: ICCVAM's mission is to facilitate development, validation, and regulatory acceptance of new and revised regulatory test methods that reduce, refine, and replace the use of animals in testing while maintaining and promoting scientific quality and the protection of human health, animal health, and the environment

▶ **Nc3rs (UK), 2004**

The NC3Rs is an autonomous body responsible for setting and delivering its strategy and the use of its resources. It is not an independent public authority and for this reason it operates under the umbrella of the Medical Research Council (MRC), using some MRC administrative systems.

Budget: €8.7M/year: "We receive core funding from the Department for Business, Innovation and Skills (BIS) via the Medical Research Council (MRC) and the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC), and the Home Office."

Mission:

1. Funding research and early career development.
2. Supporting commercialisation and facilitating technology partnering in the 3R through the open innovation programme, [CRACK IT](#).
3. Providing an evidence base for changes in policy, practice and regulation through data sharing and knowledge exchange, and dissemination through guidelines, publications, online resources and scientific events.

▶ **JAVCAM (Japan) 2005**

▶ **FICAM (Finland) 2008**

▶ **KOCVAM (South korea) 2009**

▶ **BRACVAM (Brazil) 2011**

▶ **Danish 3R-center (Denmark) 2013:** <http://www.3rcenter.dk/Sider/The-Danish-3R-Center.aspx>

Budget : €600K

The centre will have a total of 4.5 million DKK per year, of which 3 million DKK comes from the Ministry of Food, agriculture and Fisheries. Additionally, there are [1.5 million DKK reserved for research funding](#)

Ministry of Food, agriculture and Fisheries is a unique collaboration with both the pharmaceutical industry and animal organization

► SWETOX (Sweden) 2013: <http://swetox.se/en/>**Budget : €16M for the start based on grants**

Collaboration between 11 of Sweden's leading universities promises to combine the mode-of-action approach to toxicology and risk assessment with the better-known 3R: to replace, reduce and refine animal tests.

1st: Interdisciplinary work is imperative for qualified risk assessment. Academic collaboration provides us with a unique opportunity to pursue advanced, interdisciplinary research in the health- and environmentally-related toxicological sciences.

2nd: Education is a foundation stone in future risk assessment work and for the development of the toxicological sciences from both a national and international perspective.

3rd: All aspects under one umbrella. Swetox can study how chemicals affect health and environment regardless of how the chemical is used and regulated. Activities will cover everything from analytical chemistry to toxicology and policy issues.

4th: From computer modelling to humans. At Swetox Södertälje we have the expertise and equipment to integrate computer models, cell-based systems and animal experiments. This increases the ability to understand and prevent damage to the environment and predicting risks to human health.

5th: Closer relations between research, innovation and application. Synergies between academic and commissioned research provides new opportunities for impact on diverse areas of need in society.

6th: New methods in achieving a non-toxic environment. Development and use of new and more effective methods for toxicological risk assessment is key. In this work Swetox seeks to become a national leader when it comes to replacement, reduction and refinement of animal testing (3R).

7th: Strong arguments in chemicals policy. Through Swetox we build a national platform with the potential to create new knowledge that could influence and change national and international regulations and provide strong scientific arguments in chemical politics.

ANNEXE 6

LE GLOSSAIRE

3R	:	Remplacer, Réduire, « Raffiner »
ADME	:	Absorption Distribution Métabolisme et Elimination
ADN	:	Acide DésoxyriboNucléique
AESA	:	Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire
AFNOR	:	Agence Française de NORmalisation
AFSTAL	:	Association Française des Sciences et Techniques de l'Animal de Laboratoire
AMM	:	Autorisation de Mise sur le Marché
ANR	:	Agence Nationale de la Recherche
ANSES	:	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANSM	:	Agence Nationale du Médicament et des produits de santé
ANTIOPEs	:	Réseau national français pour le développement des outils prédictifs pour la toxicologie environnementale
AOAC	:	Association of Official Analytical Chemists
AOP	:	Adverse Outcome Pathways
APESA	:	Centre Technologique en Environnement et Maîtrise des Risques
ASPA	:	Agents de Surface et Produits Auxiliaires
BCOP	:	Bovine Cornea Opacity and Permeability
BPC	:	Bonnes Pratiques Cliniques
BPF	:	Bonnes Pratiques de Fabrication
BPL	:	Bonnes Pratiques de Laboratoire
BSP	:	Programme de standardisation biologique
CCPA	:	Conseil Canadien de Protection des Animaux
CE	:	Communauté Européenne
CEA	:	Commissariat à l'Energie Atomique
CEFIC	:	European Chemical Industry Council
Cellules CaCo2	:	Modèle de passage et de métabolisme intestinal
CEN	:	Comité Européen de Normalisation
CESIO	:	Comité Européen des agents de Surface et de leurs Intermédiaires Organiques
CLHP	:	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CL-SM	:	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
CLP	:	Classification Labelling Packaging
CNEA	:	Commission Nationale de l'Expérimentation Animale
CNREEA	:	Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale
CNRS	:	Centre National de la Recherche Scientifique

COLIPA	:	European cosmetic association
DM	:	Dispositifs Médicaux
DMDIV	:	Dispositifs Médicaux de Diagnostic <i>In vitro</i>
DPRA	:	Direct Peptide Reactivity Assay
ECHA	:	European CHemicals Agency
ECOPA	:	European COnsensus Platform for Alternatives
ECVAM ou CEVMA	:	European Centre for the Validation of Alternative Methods ou Centre européen pour la validation des méthodes alternatives
DEQM ou DEQM	:	European Directorate for the Quality of Medicines and healthcare ou Direction Européenne de la Qualité du Médicament
EFFCI	:	European Federation for Cosmetic ingredients
EFOR	:	Etudes Fonctionnelles sur les animaux modèles
EFPIA	:	European Federation of Pharmaceuticals Industries and Associations
EFSA	:	European Food Safety Authority
ELISA	:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPAA	:	European Partnership for Alternative Approaches to animal testing
ERASM	:	Environmental Risk Assessment Steering Management committee
ES	:	Embryonic Stem
EST	:	Embryonic Stem cell Test
F&F	:	Food and Fecundity
FEBEA	:	Fédération des Entreprises de la BEAuté
GIRCOR	:	Groupe Interprofessionnel de Réflexion et de COmmunication sur la Recherche
GIS	:	Groupement d'Intérêt Scientifique
GRICE	:	Groupement de Réflexion Interprofessionnel sur les Comités d'Ethique
Hepa-RG	:	Human Hepatocyte Cell Ligne
HERA	:	Human and Environmental Risk Assessment
hERG	:	Modèle cellulaire pour prédire des effets cardiotoxiques
HPLC	:	High Performance Liquid Chromatography
IATA	:	Integrated Approaches to Testing and Assessment
IASP	:	Association internationale pour l'étude de la douleur
IBiSA	:	Réseau Opérationnel de Centres pour faciliter l'Accès et la Distribution des modèles souris
ICAPO	:	International Council on Animal Protection at OECD programmes
ICCR	:	International Cooperation on Cosmetic Regulation
ICCVAM	:	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
ICH	:	International Conference of Harmonisation
ICTAM	:	International Co-operation on Alternative Test Methods
IgE	:	Immunoglobuline E

IMI	:	Innovative Medicines Initiative
INERIS	:	Institut National de l'Environnement industriel et des RISques
INGRECOS	:	INGREdients COSmétiques
INRA	:	Institut National de la Recherche Agronomique
INRS	:	Institut National de Recherche et de Sécurité
INSB	:	Institut National des Sciences Biologiques
INSERM	:	Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
iPS	:	Induced Pluripotent Stem
IRM	:	Imagerie par Résonance Magnétique
ISO	:	International organization for standardization
ITS	:	Integrated Testing Strategies
JaCVAM	:	Japanese Center for the Validation of Alternative Methods
JRC	:	Joint Research Centre
LAL	:	Limulus Amebocyte Lysate
LEEM	:	Les entreprises du médicament
LFDA	:	La Fondation Droit Animal, Ethique et Sciences (ex Ligue Française des Droits de l'Animal)
LLNA	:	Local Lymph Node Assay
LRI	:	Long Range Research Initiative
MAAP	:	Ministère de l'Alimentation de l'Agriculture et de la Pêche
MESR	:	Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
MET	:	Microscopie Electronique à Transmission
NC3R	:	National Center Replace Reduce Refine UK
NRU	:	Neutral Red Uptake
OCDE ou OECD	:	Organisation de Coopération et de Développement Economiques ou Organisation for Economic Co-operation and Development's
OCDE TG	:	Organisation de Coopération et de Développement Economiques (Test Guidelines)
OGM	:	Organismes Génétiquement Modifiés
OIE	:	Organisation mondiale de la santé animale
Omics	:	Néologisme anglais qui désigne un domaine d'étude en biologie se terminant par le suffixe « -omique », tel que la génomique, la transcriptomique, la protéomique ou la métabolomique
OMS-FAO	:	Organisation Mondiale de la Santé - Food and Agriculture Organization of the United Nations
ONG	:	Organisation Non Gouvernementale
OPAL	:	Recherche expérimentale et protection de l'animal de laboratoire
PBPK	:	Physiologically Based Pharmacokinetic
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PME	:	Petites et Moyennes Entreprises
PNSE	:	Plan National Santé Environnement
QSAR	:	Quantitative Structure-Activity Relationship

R&D	:	Recherche et Développement
REACH	:	Registration, Evaluation, Autorisation of Chemicals
rLLNA	:	Reduced Local Lymph Node Assay
RMN	:	Résonance Magnétique Nucléaire
SCHER	:	Scientific Committee on Health and Environmental Risk
SIMV	:	Syndicat de l'Industrie du Médicament et réactif Vétérinaires
SPA	:	Société Protectrice des Animaux
SPECT	:	Single Photon Emission Computed Tomography
SPTC	:	Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire
TEP	:	La Tomographie par Emission de Positrons
THP-1	:	Lignées cellulaires humaines de type monocytaire
U.I.	:	Unités Internationales
UIC	:	Union des Industries Chimiques
US EPA	:	United States Environmental Protection Agency
UTC	:	Université de Technologie de Compiègne
VMG	:	Validation Management Group



Plate-forme nationale pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale

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

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

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