

FRANCE / EUROPE

LA DROSOPHILE : VERS UNE NOUVELLE MÉTHODE DE REMPLACEMENT POUR L'ÉTUDE DU VIEILLISSEMENT DU SYSTÈME NERVEUX

Drosophila melanogaster (mouche du vinaigre) est largement utilisée dans la recherche sur les processus biologiques et les mécanismes pathologiques. Ce modèle expérimental a le potentiel de pouvoir remplacer l'expérimentation animale telle que désignée par la directive sur la protection des animaux utilisées à des fins scientifiques et, en particulier, chez les rongeurs.

Afin de promouvoir l'utilisation de ce modèle alternatif, la recherche conduite par le Dr Alessio Vagnoni au sein du laboratoire de biologie moléculaire du conseil de la recherche médicale britannique (MRC) se propose de développer et valider un modèle basé sur la drosophile pour l'étude des pathologies du système nerveux telles que la démence. Ces efforts ont été récemment reconnus et récompensés par le centre NCR3 qui a octroyé une bourse d'étude au Dr Vagnoni (bourse d'étude David Sainsbury). Selon les déclarations de la présidente du centre NC3R « la recherche du Dr Vagnoni fait recours à des nouvelles techniques d'imagerie qui exploitent la transparence des ailes de la drosophile afin de pouvoir observer en temps réel le vieillissement des neurones. Les données générées par l'imagerie seront intégrées aux résultats obtenus grâce à des études *in vitro* portant sur des cellules souches. L'ensemble de ces informations permettra de mieux comprendre le transport axonal et la distribution des mitochondries le long des axones.

La présidente du centre NC3R a déclaré que « le projet du Dr Vagnoni est un excellent exemple qui démontre comment le développement de nouvelles technologies permet de surmonter le besoin de conduire des expériences scientifiques chez les rongeurs »

<https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/alessio-vagnoni-awarded-david-sainsbury-fellowship-for-work-on-neuronal-ageing-in-a-non-mammalian-model/>

<https://www.nc3rs.org.uk/news/promising-research-neuronal-ageing-non-mammalian-model-recognised-david-sainsbury-fellowship>

ESSAIS CLINIQUES ASSISTÉS *IN SILICO* : L'ALLIANCE AVICENNA

La publication d'une feuille de route pour l'introduction d'essais cliniques *in silico* (essais effectués au moyen d'outils informatisés) par le projet AVICENNA correspond à la volonté de la Commission Européenne d'établir une stratégie scientifique en termes d'application de techniques computationnelles à la recherche clinique. Ces approches *in silico* sont définies comme des simulations par ordinateur permettant d'assister le développement et l'évaluation réglementaire d'un produit médicamenteux, d'un dispositif médical ou d'une étude d'intervention.

La feuille de route donne un aperçu sur les applications actuelles d'outils *in silico* lors des essais cliniques et identifie les axes de progrès scientifiques et technologiques qui permettraient de faciliter l'adoption de ces méthodes sur une plus grande échelle.

Le projet AVICENNA, une fois achevé, se prolonge par une

alliance dont l'objectif est de réaliser cette feuille de route et d'identifier les obstacles politiques et réglementaires qui se posent dans ce domaine. Cette alliance est un partenariat entre l'initiative de recherche de « l'être humain physiologique virtuel¹ » et les acteurs de l'industrie informatique, du médicament, des dispositifs médicaux, et des produits de beauté.

<http://avicenna-isct.org/roadmap/>

¹ Virtual Physiological Human Institute
<http://www.vph-institute.org/>

LE PROJET D'APPROCHE DE RÉGULARITÉ DE PRODUCTION POUR LES VACCINS : UNE INITIATIVE DE L'EPAA

F. De Mattia, C. Hendriksen, K.H. Buchheit and al.

L'approche de la régularité de production pour les tests de libération de vaccins établis promeut l'utilisation d'essai *in vitro* analytique, non basé sur un système animal, qui permet le suivi des paramètres de qualité au cours de l'ensemble du processus de production. En utilisant des méthodes non-animales très sensibles, l'approche de la régularité de production a le potentiel d'améliorer la qualité des tests et de favoriser les 3R (remplacement, raffinement et réduction de l'utilisation des animaux) pour le contrôle de qualité des vaccins. Ce concept offre une alternative à la stratégie actuelle de contrôle qualité qui requiert souvent une grande quantité d'animaux de laboratoire. Afin de faciliter l'introduction de l'approche de la régularité de production pour le contrôle qualité des vaccins à usage humain ou vétérinaire, le Partenariat Européen pour les Alternatives à l'expérimentation Animale (EPAA) a lancé le projet « Projet d'une approche de régularité de production pour les vaccins » visant à développer et valider cette approche avec les parties prenantes du milieu universitaire, des organismes de réglementation, des OMCLs², de la DEQM³, de la Commission européenne et de l'industrie. L'article publié par De Mattia et al. dans *PharmeuropaBio & Scientific Notes* résume les progrès accomplis depuis le lancement du projet.

https://www.edqm.eu/sites/default/files/article_the_vaccines_consistency_approach_project_an_epaa_initiative_2015.pdf

Cet article est publié dans *PharmeuropaBio & Scientific Notes* de la Direction Européenne de la Qualité du médicament & des Soins de Santé (EDQM), 7 allée Kastner, CS 30026, FR-67081 Strasbourg Cedex; Internet : <http://www.edqm.eu>

La distribution de l'article ci-dessus par l'intermédiaire de Francopa est autorisée officiellement par l'EDQM. Seul l'article publié dans *PharmeuropaBio & Scientific Notes* fait autorité: toute révision pourra être effectuée sans préavis et sera exclusivement accessible sur le site de l'EDQM. Nous encourageons les lecteurs à consulter régulièrement le site de l'EDQM pour s'assurer qu'ils possèdent la dernière version en date.

Cet article est disponible gratuitement en ligne (<http://pharmeuropa.edqm.eu/PharmeuropaBioSN/>) en sélectionnant « 2015 » sur le côté gauche ou en utilisant l'outil de recherche. Un identifiant et un mot de passe sont requis pour avoir accès à l'article. Si vous n'avez jamais été enregistré pour une consultation en ligne de *Pharmeuropa*, vous pouvez créer votre compte gratuitement sur <http://pharmeuropa.edqm.eu/home/> en sélectionnant « Login » dans le coin supérieur droit de la page puis « Register ».

² OMCL : réseau de laboratoires officiels de contrôle des médicaments

³ DEQM : Direction Européenne de la qualité du médicament et Soins de Santé

ALTEX : FOCUS SUR LE READ-ACROSS

Le numéro 2 du volume 33 de la revue ALTEX propose un focus sur les prédictions toxicologiques par lecture-croisée (read-across) et sur les mégadonnées (big-data) en toxicologie. Ce numéro, propose notamment un article sur les bonnes pratiques qui pourraient être appliquées lors de la dérivation des prédictions par read-across et un article sur le concept de similarité biologique. Ce dernier concept devrait permettre d'améliorer la fiabilité des prédictions obtenues par read-across.

<http://www.altex.ch/Home.12.html>

NOUVEAU DOCUMENT GUIDE DE L'ECHA SUR LES MODÈLES (Q)SAR

L'ECHA a mis à jour le document guide sur l'utilisation des modèles (Q)SAR dans le cadre du règlement REACH. Cette nouvelle version contient plus de recommandations et d'exemples que la version précédente. En particulier, le nouveau document guide donne plus de renseignements sur les outils (Q)SAR les plus couramment utilisés et sur les exigences réglementaires de l'annexe XI du règlement.

http://echa.europa.eu/view-article/-/journal_content/title/further-advice-on-how-to-use-q-sars-for-reach-registration

INTERNATIONAL

LES NIH EXAMINENT LEURS PRATIQUES DE RECHERCHE SUR LES PRIMATES NON HUMAINS

Les instituts américains de la santé (NIH, National Institutes of Health) sont en train de faire le point sur l'utilisation de primates non humains lors des expérimentations conduites au sein de tous les laboratoires qui les composent. Cet été, suite à une demande du congrès des Etats-Unis, les NIH organiseront un séminaire afin d'examiner les aspects éthiques et les procédures qui concernent l'utilisation de singes, babouins et d'autres primates. En décembre 2015, les NIH avaient déjà annoncé leur volonté d'éliminer progressivement tout recours à l'expérimentation chez les primates pour des raisons budgétaires. Entre-temps l'association de défense des droits des animaux PETA a communiqué qu'elle continuera de remettre en question l'expérimentation conduite chez les primates aux NIH tout en souhaitant que le séminaire puisse représenter l'hétérogénéité des points de vue sur ce sujet.

<http://www.sciencemag.org/news/2016/02/nih-review-its-policies-all-nonhuman-primate-research>

<http://www.sciencemag.org/news/2015/12/decision-end-monkey-experiments-based-finances-not-animal-rights-nih-says>

FORMATION SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES : LES ACTIVITÉS DU CAAT

Les centres américain et européen pour les alternatives à l'expérimentation animale (CAAT-US and CAAT-EUROPE, <http://caat.jhsph.edu/>) ont formé une co-entreprise nommée « CAAT Academy » dont le but est d'organiser des formations sur les méthodes alternatives. Trois sessions sont prévues lors du premier semestre 2016 : « modèles et outils *in silico* dans le cadre du règlement REACH », « méthodes alternatives pour la nouvelle pharmacopée européenne » et « l'AOP pour la stéatose hépatique et les tests *in vitro* sur hépatocytes »

<http://www.eventbrite.com/o/center-for-alternatives-to-animal-testing-caat-a-joint-venture-between-university-of-konstanz-and-johns-hopkins-university-9880816924>

L'EPA ET LA RÉDUCTION DE L'EXPÉRIMENTATION ANIMALE

L'EPA a annoncé la publication d'un document qui contribuera à la réduction de l'expérimentation animale. Le premier document décrit des stratégies de tests pour la mise en œuvre de méthodes alternatives lors de l'évaluation toxicologique des insecticides, fongicides et rodenticides par rapport aux effets nocifs suivants : toxicité aiguë par voie orale, cutanée, et par inhalation, irritation cutanée et oculaire, et sensibilisation cutanée.

L'EPA est aussi en train de coordonner une relecture critique d'un document sur le principe de la dispense appliqué aux tests de toxicité aiguë cutanée habituellement conduits sur les pesticides. Ce deuxième document aura aussi un effet significatif sur la promotion de la réduction de l'expérimentation animale.

<https://www.epa.gov/pesticides/>

[new-epa-guidance-testing-pesticides-will-reduce-animal-testing](https://www.epa.gov/pesticides/new-epa-guidance-testing-pesticides-will-reduce-animal-testing)

LE PRINCIPE DES 3R ET LA RECHERCHE SUR LA FAUNE SAUVAGE

Dans l'article paru dans la revue « Journal of Wildlife Diseases » le vétérinaire Johan Lidsjö et les autres co-auteurs évoquent plusieurs pistes de réflexion pour une application systématique du principe des 3R à la recherche sur la faune sauvage. Notamment, sur la base de l'expérience accumulée en laboratoire lors de la mise en pratique des méthodes de remplacement, réduction et raffinement, les auteurs de l'article proposent trois axes d'améliorations pour améliorer le bien-être animal dans le cadre des programmes de recherche sur la faune sauvage :

1. la création d'une structure organisationnelle qui fixe les standards en termes d'application du principe des 3R et qui permet à toutes les personnes qui la composent de proposer des solutions innovantes ;
2. la promotion d'initiatives visant à sensibiliser tous les acteurs concernés par le bien-être animale ;
3. le financement de la recherche sur les 3R accompagnée par une validation et une promotion de la mise en œuvre des méthodes proposées.

J. Lidsjö et al., (2016) Animal Welfare from mouse to moose- implementing the principles of the 3Rs in wildlife research. J Wildl Dis 52:65-77

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26845301>

MANIFESTATIONS

CONGRÈS EUSAAT SUR LES ALTERNATIVES À L'EXPÉRIMENTATION ANIMALE

Le 17ème congrès organisé par la société européenne pour les alternatives à l'expérimentation animale aura lieu le 24-27 août 2016 à Linz en Autriche. Parmi les sujets qui seront traités : aspects éthiques et légaux, multi-organ-chips, cellules souches, modèles *in vitro* les pathologies humaines, toxicité par dose répétée, nano-toxicologie et bio-barrières...

<http://www.eusaat-congress.eu/>

CONGRÈS FELASA 2016

La fédération européenne des laboratoires de recherche animale organise à Bruxelles du 13 au 16 juin 2016 son congrès annuel sur les modèles animaux. Parmi les sujets traités : modèles animaux de maladies infectieuses, imagerie, « organ on chip », bien-être animal, programmes 3R, zoonoses, souffrance animale, bonnes pratiques en matière de sécurité au travail, éducation et formation...

<http://felasa2016.eu/>

RENCONTRE SUR LA RÉDUCTION DE LA SOUFFRANCE ANIMALE ORGANISÉE PAR LA RPSCA

La société royale britannique pour la prévention de la cruauté envers les animaux (RPSCA) organise une rencontre internationale sur la souffrance animale le 16 et 17 juin 2016 à Bruxelles. Cet événement aura lieu juste après le congrès FELASA 2016 et il concerne les personnes qui sont directement concernées par l'expérimentation animale. L'objectif de cette rencontre est de sensibiliser et informer de façon exhaustive les personnes concernées par les interventions et manipulations qui occasionnent aux animaux une contrainte sévère à très sévère ou une contrainte légère de durée moyenne à longue. Cette rencontre s'adresse en particulier aux personnes qui sont concernées par la directive européenne 201/63/EU/

<https://www.nc3rs.org.uk/events/>

rspca-international-meeting-focus-severe-suffering

CONFÉRENCE EUROPÉENNE SUR LES ALTERNATIVES À L'EXPÉRIMENTATION ANIMALE

Le 6 et 7 décembre 2016 la Commission européenne organisera à Bruxelles une conférence ayant pour titre « approches non-animales - la voie à suivre ». Cette conférence stimulera le débat autour de la validité des modèles animaux et des opportunités offertes par les avancées scientifiques en termes de remplacement de l'expérimentation animale. Cet événement s'inscrit dans la continuité des actions entreprises par la Commission européenne afin de répondre à l'initiative citoyenne « Stop Vivisection ».

EURL-ECVAM / OCDE

QUESTIONNAIRE ECVAM SUR LES 3R

Dans le cadre des actions prônées par la Commission Européenne afin de répondre à l'initiative citoyenne européenne « Stop Vivisection » l'EURL ECVAM a réalisé un sondage d'opinion auprès de toutes les parties prenantes concernées par les 3R. L'objectif du questionnaire élaboré par l'EURL ECVAM était de :

1. identifier toutes les sources d'information qui pourraient être pertinentes pour les 3R,
2. comprendre comment les connaissances dans ce domaine sont diffusées et promues,
3. mettre en évidence les actions qui pourraient être mises en œuvre pour palier au manque de connaissance concernant les 3R.

Les résultats de ce sondage feront l'objet d'une étude exhaustive conduite par la Commission sur toutes les possibilités offertes par une application systématique des approches 3R dans les domaines de la recherche scientifique,

la toxicologie réglementaire et l'éducation. Cette étude sera rendue publique avant la fin de l'année 2016

<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>

alternatives-to-animal-testing-eu-public-survey-launched

QUESTIONNAIRE OCDE SUR LES AOP

L'OCDE vient de clôturer un sondage dont l'objectif était d'explorer l'utilité des « chemins de l'effets néfaste » (AOP) dans un cadre réglementaire et d'identifier les priorités de développement. Les résultats de ce sondage permettront à l'OCDE de servir au plus près les besoins réglementaires exprimés.

RAFFINEMENT : LE SITE WEB "HUMANE ENDPOINTS"

Le site web « Humane Endpoints » propose des informations sur le comportement normal et pathologique des rats et souris afin d'aider le raffinement des études *in vivo*. Notamment, le site « Humane Endpoints » propose des renseignements sur la douleur et le stress engendrés par les expérimentations *in vivo* et il met à disposition une grande base de données (photographies et vidéos) sur les symptômes cliniques chez les animaux.

<https://www.humane-endpoints.info/en>

COURRIER DES LECTEURS

UNE MÉTHODE ALTERNATIVE À L'EXPÉRIMENTATION ANIMALE ENCORE NÉGLIGÉE : LA XÉNOGREFFE SUR MEMBRANE CHORIOALLANTOÏDIENNE D'OEUF FÉCONDÉ DE POULE

L'écrasante majorité des études de xénogreffes fait appel à des modèles murins immunodéprimés dont la mise en œuvre est longue, coûteuse et soumise aux lourdes contraintes liées à l'expérimentation animale. Il existe cependant quelques modèles alternatifs dépourvus de telles contraintes administratives, beaucoup moins onéreux et produisant des résultats plus rapidement.

L'un de ces modèles est basé sur l'utilisation d'œufs fécondés de poule, en particulier, l'usage d'une annexe extra-embryonnaire : la membrane chorioallantoïde d'embryon de poulet (CAM : chorio allantoic membrane)

La CAM est l'homologue du placenta des mammifères. Elle est constituée d'un mésenchyme d'origine mésodermique très richement vascularisé qui résulte de la fusion entre le mésoderme de l'allantoïde et l'ectoderme du chorion. Sa formation débute dès le milieu du troisième jour d'incubation et se poursuit jusqu'au douzième jour où elle recouvre la surface interne de la coquille de l'œuf.

Au cours du développement de la CAM, une riche vascularisation se développe et favorise les échanges gazeux mais aussi calciques entre l'embryon et son environnement. En raison de cette vascularisation extensive, la CAM constitue un excellent modèle pour supporter la croissance *ex vivo* de différents tissus implantés. Elle est utilisée soit en condition *in ovo* (une ouverture dans la coquille pour accéder à la CAM), soit en condition *ex ovo* (culture de l'œuf hors de sa coquille dans une coupelle en polystyrène).

Connu depuis le début du 20^{ème} siècle (Murphy et al. 1912⁴), ce modèle est un système intermédiaire entre les tests *in vitro* dont il garde la simplicité et les expérimentations *in vivo* dont il présente la pertinence. La particularité de ce modèle est d'être dépourvu de défense immunitaire totalement fonctionnelle pendant les premiers 18 jours d'incubation ce qui permet de greffer sur la CAM des cellules de différentes origines (animales ou humaines) sans risque de rejet des xénogreffes. Ce modèle est une alternative de choix à l'expérimentation animale. L'un des avantages de ce modèle est qu'il autorise l'ensemble des techniques de microscopie intra-vitale pendant toute la durée de l'expérimentation.

L'une des applications les plus développées avec la CAM est l'étude de l'activité angiogénique ou anti-angiogénique de molécules. Ce modèle CAM vient en remplacement de modèles *in vivo* tels que les tests sur la cornée de rongeurs, les tests sur l'oreille de lapin ou sur la peau dorsale de rongeur. Cependant, les domaines d'application sont assez diversifiés et englobent les xénogreffes de cellules tumorales dissociées en rapport avec une réponse angiogénique, l'extinction de gènes spécifiques, l'électroporation par des vecteurs d'expression, l'infection virale.

Ce modèle a été utilisé pour évaluer les formulations de différents médicaments ainsi que l'efficacité de leurs moyens d'administration (drug delivery systems). En outre, il est possible de comparer les résultats obtenus sur CAM, sur modèles murins et les pathologies humaines (Durupt et al. 2012⁵, Hagedorn et al. 2005⁶)

Ce modèle a donc à ce jour une multitude de fonctions dans la recherche et verra probablement le nombre de ses applications se développer dans un futur proche. Il est important de noter que l'industrie pharmaceutique fait depuis longtemps appel aux œufs pour la production de ses vaccins.

Il faut rappeler ici que depuis juillet 2013, la législation Européenne interdit l'usage d'animaux de laboratoire pour tester des produits à destinée cosmétique (CE 1223/2009)

A ce stade il est bon de préciser trois éléments :

1. une législation nationale autorise l'utilisation de la CAM dans le cadre de recherches expérimentales (Arrêté 1996-11-29 annexe du JORF du 26 décembre 1996 : « Méthode officielle d'évaluation du potentiel irritant sur la membrane chorio-allantoïdienne d'œuf de poule ») en remplacement de l'expérimentation animale précédemment utilisée et dorénavant interdite en France pour les laboratoires de Cosmétologie.
2. la Food and Drug Administration (FDA), dont la rigueur n'est plus à démontrer, a validé le modèle CAM pour certaines études de toxicologie, notamment pour les produits cosmétiques, ouvrant ainsi le marché américain aux laboratoires qui maîtrisent cette technique.
3. Ce modèle n'est pas considéré comme un modèle animal et échappe donc aux lourdes contraintes administratives

⁴ Murphy JB, Rous P. (1912) The behavior of chicken sarcoma implanted in the developing embryo, (1912) *J Exp Med.* **15(2)**:119-32.

⁵ Durupt, F., et al. (2012). The chicken chorioallantoic membrane tumor assay as model for qualitative testing of oncolytic adenoviruses. *Cancer Gene Ther.* 19, 58-68.

⁶ Hagedorn, M., S. Javerzat, D. Gilges, A. Meyre, B. de Lafarge, A. Eichmann and A. Bikfalvi (2005). "Assessing key steps of human tumor progression *in vivo* by using an avian embryo model." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102(5)**: 1643-1648.

et immobilières expérimentales liées à l'expérimentation animale.

Enfin, si cette technique présente les avantages tangibles mentionnés ci-dessus, les couvoirs susceptibles de fournir les œufs embryonnés étant de plus en plus rares en France, l'approvisionnement des œufs à un coût raisonnable devient problématique.

Les couvoirs, qui approvisionnent à la fois les laboratoires de recherche mais également des industries alimentaires, subissent de lourdes contraintes réglementaires Européennes quelle que soit la destination de leurs œufs. Cette nouvelle réglementation impose à ces couvoirs de lourds investissements mais entraîne aussi de nouveaux frais de fonctionnement. Certains producteurs ne peuvent faire face à toutes ces contraintes et sont obligés de cesser leurs activités. Il serait toutefois dommage de se passer d'un tel modèle, dont l'intérêt n'est plus à démontrer et qui représente une alternative crédible et puissante à l'expérimentation animale, notamment en cancérologie et en dermatologie. Rappelons à ce sujet que la loi française est très favorable au développement de ce type de modèle.

Philippe NIRDÉ

Philippe NIRDÉ est chargé de Recherche au CNRS, à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR 5247, Montpellier). Après une décennie passée en parasitologie à l'Institut Pasteur (Unité André Capron, Lille) à prospecter pour de nouvelles cibles parasitaires, puis à l'IRD pour étudier les mécanismes de résistances des populations de *Tyranosomes*. Il rejoint ensuite une unité de cancérologie qui le conduit aujourd'hui à développer un programme sur les thérapies individualisées faisant intervenir des modèles expérimentaux alternatifs à l'expérimentation animale.

Directeur de la publication : Philippe HUBERT

Directeur de la rédaction : Enrico MOMBELLI

Maquette : Vanessa VEG

FRANCOPA est constitué des représentants des structures suivantes :

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

- ISSN en cours -