



Compte-rendu du débat INERIS – ONG

Les méthodes alternatives en expérimentation animale : concilier protection animale et amélioration de la prédiction.

INERIS Références 2013

12 février 2014

Sommaire

Liste des participants	3
Introduction	4
Le résumé des travaux	4
Points clés des présentations.....	7
Discussion relative aux travaux présentés	9
Documents distribués	11
INERIS en bref	12
Contacts INERIS	12

Liste des participants

ONG/Associations

Prénom	Nom	Organisme
G.L.	Andrieu-Koechlin	Pro Anima - ESF
Maryse	Arditi	FNE
Thierry	Auffret Van Der Kemp	LFDA
Francis	Glémet	CNMSE
Christiane	Laupie-Koechlin	Pro Anima - ESF
Anita	Villers	EDA

INERIS

Prénom	Nom	Organisme
Céline	Boudet	Responsable ouverture et dialogue avec la société
François	Brion	Ingénieur Unité écotoxicologie in vitro et in vivo
Enrico	Mombelli	Ingénieur Unité modèles pour l'écotoxicologie et la toxicologie
Jean-Marc	Porcher	Responsable Unité écotoxicologie in vitro et in vivo
Eric	Thybaud	Responsable Pôle dangers et impact sur le vivant
Ginette	Vastel	Directrice de la Communication

Introduction

L'INERIS, acteur de la toxicologie prédictive, travaille avec ses partenaires depuis plusieurs années sur les méthodes alternatives en expérimentation animale. Le recours à ces méthodes, exigeance éthique, est aussi une nécessité pratique dans un contexte réglementaire qui les préconise et, au-delà, dans un besoin de recherche socialement responsable y compris en accompagnement à l'innovation. C'est pourquoi, dans le cadre de sa stratégie d'ouverture à la société, l'Institut a engagé en parallèle des actions visant à renforcer son interaction avec les relais d'opinion sur des sujets qui représentent des enjeux sociétaux. INERIS Références fait partie des outils utilisés pour assurer ce dialogue¹.

Bien que l'expérimentation animale occupe encore aujourd'hui une place centrale pour évaluer la toxicité des substances, les études toxicologiques ont néanmoins tendance, avec la double évolution du corpus réglementaire (bien être animal, substances chimiques), à laisser une plus large place aux méthodes alternatives. L'INERIS développe ou évalue des méthodes alternatives en vue de la mise en œuvre de stratégies de tests intégrés permettant de remplacer, réduire ou raffiner, selon les principes exprimés par la règle des « 3R », le recours à l'expérimentation animale, principalement dans le domaine de l'évaluation de la sécurité des produits chimiques. Si le développement de l'(éco-)toxicologie prédictive est une priorité, l'Institut joue aussi un rôle dans la reconnaissance de ces méthodes, tout d'abord avec la validation du concept par les chercheurs. Mais, face au besoin croissant en méthodes alternatives, l'INERIS va plus loin : compte-tenu du temps nécessaire à la validation réglementaire et du besoin à utiliser en confiance ces méthodes dans d'autres contextes, l'Institut réfléchit à la mise en place d'un processus de pré-validation afin de faciliter le déploiement des méthodes issues de la recherche dans ce domaine. Ce processus doit accompagner le passage de la R&D à la normalisation ou à la validation réglementaire. L'INERIS est aujourd'hui l'un des deux laboratoires français du réseau européen des laboratoires pour la validation des méthodes alternatives coordonné par le Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM).

Le résumé des travaux

Les méthodes alternatives en expérimentation animale reposent principalement sur des méthodes de remplacement *in vitro* (modèles cellulaires) ou *in silico* (modèles mathématiques). Il existe aussi des méthodes de réduction, en particulier l'optimisation des protocoles *in vivo* et les méthodes statistiques, et des méthodes de raffinement comme l'imagerie du petit animal *in vivo*. De plus en plus les méthodes alternatives sont recommandées dans des approches intégratives combinant l'ensemble des informations disponibles afin de n'utiliser l'animal qu'en dernier recours.

Les experts de l'Institut travaillent ainsi sur les modèles (Q)SAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) qui permettent de relier la structure d'une molécule à son activité biologique. Ils ont ainsi contribué en partenariat avec le Centre de traitement de l'information scientifique à la

¹ INERIS Références. Les méthodes alternatives en expérimentation animale : concilier protection animale et amélioration de la prédiction. Décembre 2013.

qualification d'un système de modèles (Q)SAR (le système Benigni-Bossa) pour l'analyse du potentiel mutagène et carcinogène d'une substance chimique.

Financements : Programmes européens (6^{ème} et 7^{ème} programmes cadre), ANR et Post-Grenelle.

En savoir plus : Focus p.17 INERIS Références 2013 et références détaillées ci-après.

Pour en savoir plus :

1. **Substance-tailored testing strategies in toxicology: An in silico methodology based on QSAR modeling of toxicological thresholds and Monte Carlo simulations of toxicological testing**
By: Pery, Alexandre R. R., Desmots, S., **Mombelli, E.**
REGULATORY TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY Volume: 56 Issue: 1 Pages: 82-92 Published: FEB 2010
[Full Text](#) [View Abstract](#)
2. **Evaluation of the OECD (Q)SAR Application Toolbox and Toxtree for predicting and profiling the carcinogenic potential of chemicals**
By: **Mombelli, E.**, Devillers, J.
SAR AND QSAR IN ENVIRONMENTAL RESEARCH Volume: 21 Issue: 7-8 Pages: 731-752 Article Number: PII 930319812 Published: 2010
[Full Text](#) [View Abstract](#)
3. **Evaluation of the OECD QSAR Application Toolbox and Toxtree for estimating the mutagenicity of chemicals. Part 1. Aromatic amines**
By: Devillers, J., **Mombelli, E.**
SAR AND QSAR IN ENVIRONMENTAL RESEARCH Volume: 21 Issue: 7-8 Pages: 753-769 Article Number: PII 930319493 Published: 2010
[Full Text](#) [View Abstract](#)
4. **Evaluation of the OECD QSAR Application Toolbox and Toxtree for estimating the mutagenicity of chemicals. Part 2. - unsaturated aliphatic aldehydes**
By: Devillers, J., **Mombelli, E.**
SAR AND QSAR IN ENVIRONMENTAL RESEARCH Volume: 21 Issue: 7-8 Pages: 771-783 Article Number: PII 930319991 Published: 2010
[Full Text](#) [View Abstract](#)

INERIS
Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
pour un développement durable

Par ailleurs, l'INERIS a développé en partenariat avec l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) et soumis à la validation réglementaire de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) une méthode de réduction/raffinement pour l'évaluation du potentiel perturbateur endocrinien (PE) des substances chimiques (le test EAZY). Le projet NEMO fait la démonstration du passage de la R&D à un outil opérationnel en vue de sa validation réglementaire.

Financements : Plan national de recherche sur les perturbateurs endocriniens, Agence Nationale de la recherche (ANR) et Post-Grenelle (avenant au contrat d'objectifs Etat-INERIS – 2009).

En savoir plus : Focus p. 15 INERIS Références 2013 et références détaillées ci-après.

Pour en savoir plus...

Cosnefroy A, **Brion F**, Maillot-Maréchal E, Porcher JM, Pakdel F, Balaguer P, Aït-Aïssa S. (2012) [Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line](#). *Toxicological Sciences*,125(2):439-49.

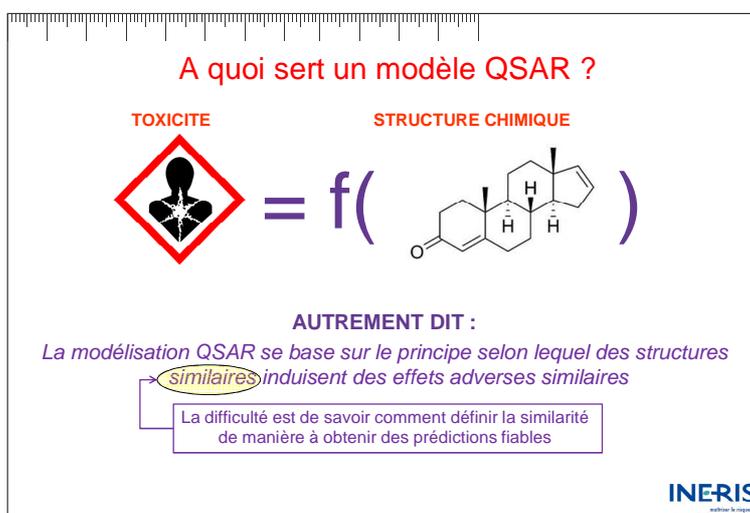
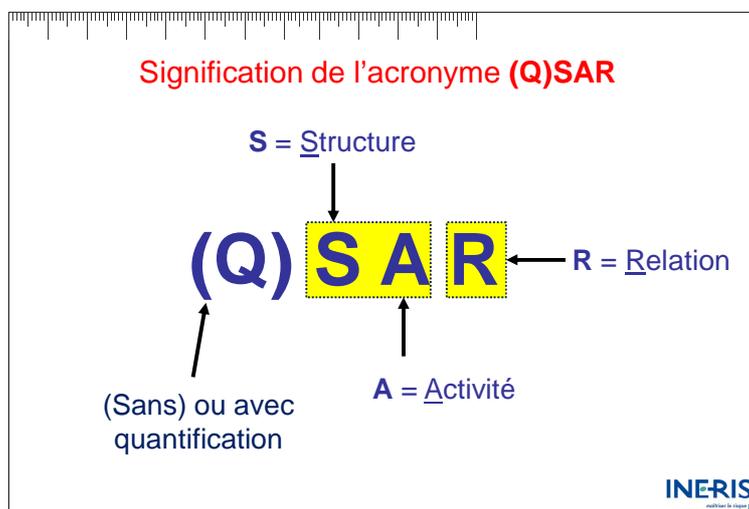
Brion F, Le Page Y, Piccini B, Cardoso O, Tong SK, Chung BC, Kah O (2012) [Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic \(cyp19a1b-GFP\) zebrafish embryos](#). *PLoS One*;7(5):e36069

A l'horizon 2020, l'Institut poursuivra ses travaux sur les approches *in vitro* et *in silico*, principalement autour des mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens, mais aussi des passages transmembranaires et de la régulation hormonale. Déjà membre fondateur de FRANCOPA (Plateforme française dédiée au développement, à la validation et à la diffusion de méthodes alternatives en expérimentation animale), d'Antiopes (Infrastructure de recherche en toxicologie prédictive) et partenaire d'alliances pour la recherche, il renforcera ses réseaux et partenariats régionaux et nationaux autour d'équipements structurants. Dans cet esprit, l'Institut a proposé dans le cadre de la Stratégie Nationale sur les Perturbateurs Endocriniens la mise en place d'un partenariat public privé autour d'une plateforme permettant la pré-validation de méthodes et garantissant une bonne crédibilité dans le dialogue entre parties prenantes.

Points clés des présentations

Premier Focus : Evaluation de modèles (Q)SAR à finalité réglementaire

Dans un premier temps, la signification de l'acronyme (Q)SAR et ce à quoi servent ces modèles est rappelé.



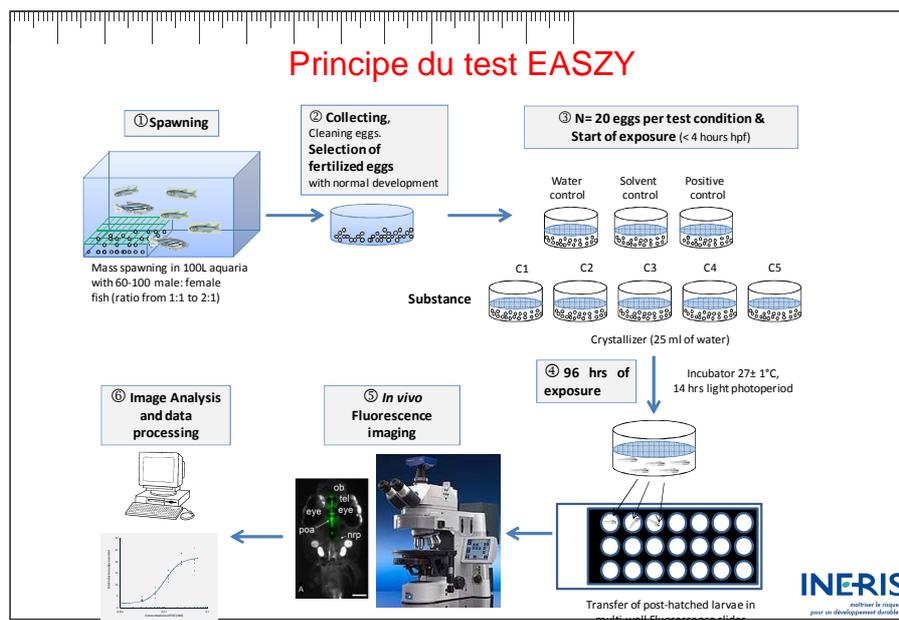
Dans un second temps, le processus d'évaluation est détaillé et illustré dans le cas de l'étude de la fiabilité, de la transparence et de la pertinence du module « Benigni-Bossa » intégré à la boîte à outils (Q)SAR de l'OCDE et à Toxtree qui sont facilement accessibles et utilisables dans un contexte réglementaire. Ce module a été développé pour évaluer le potentiel carcinogène et mutagène d'une substance. Il ressort que certains effets biologiquement complexes comme la carcinogénèse ou la reprotoxicité resteront toujours difficile à modéliser. Les performances évaluées sont inférieures à celles déclarées par le mode d'emploi du module : pour des outils (Q)SAR à finalité réglementaire, une validation indépendante des développeurs des modèles est une étape indispensable. Enfin, de manière générale, du fait de problèmes relatifs à la programmation informatique des modèles

(Q)SAR, la Toolbox de l'OCDE et Toxtree ne donnent pas toujours le même résultat lors de l'application d'un même modèle.

Second Focus : Le projet NEMO : de nouveaux modèles pour les perturbateurs endocriniens

Le projet NEMO avait pour objectif de développer de nouveaux modèles basés sur les mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) : un modèle *in vitro* en lignées cellulaires et un modèle embryonnaire.

Ces développements de nouveaux essais sont adaptés au criblage haut et moyen débit. Ils répondent aux exigences des 3R. Ils permettent chez une espèce unique une extrapolation des données *in vitro/vivo* plus aisée. Le bio-essai *in vivo* chez les embryons de poisson zèbre a donné lieu à la mise au point d'un test : EASZY (Detection of Endocrine Active Substance, acting through estrogen receptors, using transgenic cyp19a1b-GFP Zebrafish EmbrYos). Le test EASZY permet de quantifier l'activité oestrogénique des substances chez les embryons vivants. Le principe du test est détaillé ci-après. Il représente une alternative aux tests d'oestrogénicité chez les poissons adultes. Le test a été accepté dans le programme de travail du groupe en charge de développer les méthodes écotoxicologiques pour les perturbateurs endocriniens de l'OCDE. Le projet de validation international est porté par l'INERIS.



Discussion relative aux travaux présentés

Partie (Q)SAR

La modélisation (Q)SAR se base sur la similarité entre les structures. Maryse Ardit demande si la corrélation est étudiée sur les formules chimiques ou sur la façon dont les molécules sont représentées en 3D. Enrico Mombelli précise qu'il s'agit d'une approche au niveau de la structure moléculaire qui se focalise sur les propriétés physicochimiques qui modulent les effets toxiques. Ces propriétés peuvent être décrites par des descripteurs 2D (ex. nombre de doubles liaisons) ou 3D (ex. volume moléculaire).

Francis Glémet s'interroge sur le type d'activité qui est prédit. Enrico Mombelli indique que l'on peut prédire toutes sortes d'effets si les modèles peuvent être calibrés sur un nombre suffisant de molécules dont l'activité biologique a été expérimentalement caractérisée.

Anita Villers précise que les outils peuvent ne pas être adaptés à la question posée : dans ce cas le résultat doit être rejeté. L'INERIS ajoute qu'une prédiction (Q)SAR peut être acceptée si elle appartient au domaine d'application d'un modèle dont la validité scientifique a été validée. De plus l'effet prédit doit aussi avoir une pertinence réglementaire.

Maryse Ardit demande si la sensibilité d'un modèle peut être supérieure à 1. Enrico Mombelli précise que non car, par définition, un modèle qui identifie correctement toutes les substances toxiques qui lui sont soumises a une sensibilité égale à 1.

Francis Glémet demande s'il existe un seuil pour juger d'une validation externe la meilleure possible. Enrico Mombelli précise que du point de vue réglementaire, aucun seuil n'est donné. Il y a uniquement des principes et des degrés de liberté qui doivent être appliqués et interprétés au cas par cas. Eric Thybaud ajoute que lors des tests sur animaux, il y a aussi de l'incertitude. Les prédictions (Q)SAR ne peuvent pas être caractérisées par une incertitude inférieure à celle qui est associée au protocole expérimental qu'elles modélisent. Il faut faire attention aux modes d'emploi et utiliser les modèles dans leur domaine d'application. Les (Q)SAR ne sont pas des outils presse-bouton.

Maryse Ardit demande ce sur quoi la mutagénèse est vérifiée dans le système Benigni-Bossa. Enrico Mombelli précise que la validation externe vérifiée est réalisée sur des molécules qui n'ont pas été utilisées lors de la dérivation du modèle. Pour la mutagénèse, les (Q)SAR qui prédisent la génotoxicité d'Ames sont caractérisés par une fiabilité comparable à celle de l'expérimental.

Maryse Ardit s'interroge sur l'utilité du QSAR pour la prédiction du Kow (coefficient de partage entre l'octanol et l'eau). L'INERIS répond que ce coefficient permet d'estimer la biodisponibilité et donc la capacité d'une substance à traverser des barrières, ce qui est un facteur important en termes de prédiction de la toxicité.

Francis Glémet s'interroge sur l'indépendance de la validation. Eric Thybaud précise que celui qui a développé le modèle n'est pas celui qui l'évalue.

Maryse Ardit comprend que les (Q)SAR sont *in fine* constitués d'une infinité de modèles très basiques. Eric Thybaud précise que les relations ne sont pas toujours linéaires mais il ne s'agit en

effet de rien d'autre que de la mise en relation, à l'aide d'une équation, de la physicochimie avec la biologie, activité par activité. Plusieurs méthodes sont utilisées de longue date. Les travaux pionniers de Corwin Hansch datent de la fin des années 1960.

Partie NEMO

Le projet NEMO illustre l'importance de comprendre les mécanismes pour développer des outils afin de mieux les prévoir.

Francis Glémet s'interroge sur le lien possible du projet NEMO avec les pathologies induites chez l'homme par les perturbateurs endocriniens. François Brion précise que NEMO a été conduit dans un contexte environnemental. L'outil n'est développé que chez le poisson.

Francis Glémet s'interroge sur la souffrance animale. François Brion indique que chez le poisson zèbre tous les stades de développement avant 5 jours post-fécondation ne sont pas couverts par la Directive de 2010 : ces embryons sont donc exclus de la réglementation sur l'expérimentation animale. Jean-Marc Porcher ajoute que la limite de 5 jours est fixée sur des bases de sensibilité, en particulier sur l'incapacité de l'embryon à s'autoalimenter jusqu'à ce stade. Il s'agit d'une méthode *in vivo* de réduction, pas d'une méthode *in vitro* de remplacement. On obtient une réduction significative du nombre d'animaux au regard de ce qui est aujourd'hui réglementé à l'OCDE.

Par ailleurs, ce ne sont pas les effets toxiques qui sont recherchés mais les effets sub-létaux : les poissons ne meurent pas à l'issue de l'expérience. Si le cerveau ne se développe pas normalement, rien n'est observable.

Francis Glémet demande s'il existe un effet dose sur une fonction précise. François Brion précise qu'on observe un effet dose même aux doses extrêmement faibles.

Anita Villers demande si les résultats obtenus chez le poisson zèbre peuvent être transposés à d'autres espèces. François Brion indique que, pour l'instant, la démarche focalise sur une espèce modèle pour les espèces aquatiques. Eric Thybaud ajoute que réglementairement un perturbateur endocrinien ne l'est pas uniquement chez l'homme. La perturbation endocrinienne a d'abord été repérée chez l'animal (poisson et oiseau). Il est important de disposer de batteries d'outils adaptés à la faune sauvage.

Maryse Ardit s'interroge sur l'avancée de la définition d'un perturbateur endocrinien au niveau européen. Jean-Marc Porcher précise qu'une définition existe pour définir un PE du point de vue biologique. Mais le problème est de la faire rentrer dans les réglementations. Dans tous les cas on veut interdire les PE (yc avec l'autorisation dans REACH) sur la base du danger. Eric Thybaud précise que la commission européenne élabore une feuille de route pour conduire une étude d'impact qui permettrait d'estimer l'impact économique de la prise en compte de telle ou telle définition.

Francis Glémet s'interroge sur la prise en compte des PE aux US. Jean-Marc Porcher précise que pour les tests, la validation se fait au niveau international (OCDE). Mais les américains auront leur propre définition. Les japonais n'en tiennent pas compte.

Anita Villers s'interroge sur la façon dont les interdictions s'appliquent sur les substances déjà produites et mises sur le marché. Eric Thybaud indique que la production est interdite à une certaine échéance et que les produits ne sont pas retirés du marché du jour au lendemain : les stocks sont utilisés, y compris dans l'attente de produits de substitution.

Francis Glémet s'étonne que l'interdiction du BPA n'existe qu'en France. Eric Thybaud rappelle que les réglementations en matière de substances chimiques sont européennes et que les PE n'ont pas de définition réglementaire légale.

François Brion indique par ailleurs que la stratégie de tests pour reconnaître les perturbations endocriniennes reste à construire.

Maryse Arditi s'interroge sur caractère PE universel pour toutes les espèces. Eric Thybaud prend l'exemple des inhibiteurs de mue qui sont des PE chez les insectes mais pas chez les oiseaux. Cependant, Jean-Marc Porcher ajoute que l'UE pourrait considérer une substance comme PE uniquement lorsqu'elle est perturbatrice pour toutes les espèces. C'est un risque.

Lors de la présentation par Eric Thybaud du processus général de validation d'une méthode alternative en expérimentation animale, Maryse Arditi s'interroge sur la base de la validation, car on sait que même l'expérimentation animale a elle aussi des limites et des incertitudes (elle prend l'exemple des dioxines dont la dangerosité varie d'un facteur 1000 selon le modèle animal). Eric Thybaud indique que si on compare uniquement à l'existant, on retombe sur la toxicologie du XX^{ème} siècle. C'est une difficulté. Pour beaucoup de types d'effets, l'idée de remplacer intégralement une méthode par une autre n'est pas à ce jour atteignable : ce sont des stratégies de tests intégrés qui seront mises en œuvre.

Maryse Arditi ajoute que c'est bien la question de l'impact sur l'ensemble d'un système versus une partie isolée qui est au cœur des discussions. Eric Thybaud confirme que les méthodes *in vitro* « ne sont pas la vraie vie ». Pour les PE, il peut y avoir fixation sur un récepteur et aucun effet, y compris néfaste, sur l'individu et sa descendance. En écotoxicologie, il faut que l'impact néfaste se produise sur l'ensemble d'une population, pas sur un seul individu.

Documents distribués

- Le dossier de référence transmis par e-mail avant la réunion : Les méthodes alternatives en expérimentation animale : concilier protection animale et amélioration de la prédiction. INERIS Références – Décembre 2013. Disponible sur le site internet de l'INERIS (www.ineris.fr).
- Fiche ONG transmise par e-mail avant la réunion : Les méthodes alternatives en expérimentation animale : concilier protection animale et amélioration de la prédiction – INERIS Références 2013, disponible sur l'espace ONG (2014) du site internet de l'INERIS (www.ineris.fr).

INERIS en bref

Domaines d'expertise de l'INERIS :

RISQUES CHRONIQUES

Évaluation de la toxicité et de l'écotoxicité des substances chimiques. Modélisation et surveillance des atteintes à l'homme et à l'environnement générées par les pollutions, les champs électromagnétiques et dues aux installations et aux activités humaines. Réduction de la pollution des milieux ambiants et sols pollués.

RISQUES ACCIDENTELS

Évaluation des risques (incendie, explosion, rejets toxiques, foudre...) liés aux installations industrielles, aux procédés, aux produits, ainsi qu'aux infrastructures et systèmes de transports (tunnels, ports...). Maîtrise des risques par les dispositions technologiques et organisationnelles. Appui technique dans la mise en œuvre des Plans de Prévention des Risques Technologiques (PPRT).

RISQUES DU SOL ET DU SOUS-SOL

Évaluation et prévention des risques de mouvement de terrain liés aux anciennes exploitations (mines ou carrières), aux stockages souterrains ou à certains sites naturels (versants rocheux, talus, falaises...). Surveillance et auscultation des massifs rocheux ou des ouvrages. Évaluation des risques liés aux eaux souterraines et aux émanations gazeuses du sol.

SÉCURITÉ DES ÉQUIPEMENTS ET DES PRODUITS

Connaissance et classification des produits énergétiques et autres produits dangereux. Fiabilité des dispositifs technologiques de sécurité. Évaluation de la conformité réglementaire et normative des systèmes, matériels et produits dont les produits explosifs et pyrotechniques.

CONSEIL EN MANAGEMENT DES RISQUES

Conseil et accompagnement dans la mise en place de systèmes de management Hygiène, Santé, Sécurité, Environnement (HSSE). Aide à l'intégration des systèmes de management QHSE. Développement d'outils de diagnostic et analyse des causes humaines et organisationnelles après un accident. Suivi et diagnostic réglementaires.

Portail INERIS : www.ineris.fr

Contact INERIS

Ginette Vastel, Directrice de la communication

ginette.vastel@ineris.fr / 03 44 55 66 08

Céline Boudet, Responsable ouverture et dialogue avec la société

celine.boudet@ineris.fr / 03 44 55 65 95