



HAL
open science

Les alternatives aux essais toxicologiques préclinique in vivo des médicaments à usage humain

Morgane Souchal

► **To cite this version:**

Morgane Souchal. Les alternatives aux essais toxicologiques préclinique in vivo des médicaments à usage humain. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03373026

HAL Id: dumas-03373026

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03373026v1>

Submitted on 11 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2021

Thèse n°104

THESE POUR L'OBTENTION DU
DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par SOUCHAL, Morgane

Né(e) le 20/02/1992 à Bordeaux

Le 29/09/2021

**LES ALTERNATIVES AUX ESSAIS TOXICOLOGIQUES
PRE-CLINIQUE *IN VIVO* DES MEDICAMENTS A
USAGE HUMAIN**

Sous la direction de : Arnaud COURTOIS

Membres du jury :

Mme. DUFOURC , Pascale
M. COURTOIS, Arnaud
Mme. HUTTER, Laurence

Président
Rapporteur
Rapporteur

Titre : Les alternatives aux essais toxicologiques pré-clinique *in vivo* des médicaments à usage humain

Résumé : L'étude de la toxicologie est en pleine mutation grâce aux avancées technologiques en biologie, en biotechnologie mais aussi en informatique. Depuis les premières méthodes d'études sur les animaux, la modélisation des effets toxiques chez l'Homme est devenue aujourd'hui multisupport : l'animal reste un modèle incontournable, mais d'autres comme les cultures cellulaires ou les modèles *in silico* prennent de plus en plus d'importance. Les études précliniques ainsi que la réglementation qui l'encadre évoluent rapidement. En outre, il existe une pression politique et sociale croissante pour développer des alternatives aux modèles animaux selon le principe des 3R (réduction, raffinement et remplacement des modèles animaux). L'objectif est d'améliorer la prédictivité de la toxicité d'une substance médicamenteuse pour garantir la sécurité du patient. Pour cela, ce n'est plus le meilleur modèle qui est recherché mais la meilleure combinaison de modèles, IATA (pour Integrated Approaches to Testing and Assessment). Ces approches plus flexibles d'évaluation de la sécurité chimique sont fondées sur l'intégration et la traduction des données dérivées de différentes méthodes et de sources multiples. Cette approche est celle qui est encouragée par les organismes de réglementations.

Ce document a pour but de revenir sur les exigences réglementaires précliniques de la mise sur le marché d'un médicament et les différentes approches possibles pour y parvenir.

Mots clés : expérimentation animale, méthodes *in vitro*, modèles *in silico*,

Title : Alternatives to preclinical *in vivo* toxicity testing of medicinal products for human use

Abstract : Toxicity testing is at a pivotal change thanks to technological advances in biology, biotechnology but also computer sciences. Since the first animal studies methods, the modeling of toxic effects in humans has now become multi-media: the animal remains an essential model, but others such as cell cultures or *in silico* models are becoming more and more important. Preclinical studies and their regulations are rapidly evolving. In addition, there is a growing political and social pressure to develop alternatives to animal models according to the principle of the 3Rs (reduction, refinement, and replacement of animal models).

The objective is to improve the predictivity of the toxicity of a drug to ensure patient safety. For this, it is no longer the best model that is sought but the best combination of models, IATA (for Integrated Approaches to Testing and Assessment). These more flexible approaches to chemical safety assessment are based on the integration and translation of data derived from different methods and multiple sources. This approach is the one encouraged by regulators.

The purpose of this document is to review the preclinical regulatory requirements for drug commercialization and the different possible approaches to achieve this.

Keywords : animal testing, *in vitro* methods, *in silico* models

Je dédicace cette thèse à ma grand-mère,

Je tâcherais de vivre chaque jour à 1000% en riant et en chantant, comme tu l'as toujours fait.

Remerciements :

Le monde est devenu un endroit inédit et ce que nous tenions pour acquis s'est ébranlé lorsque la pandémie est devenue notre quotidien. Pour moi, elle fut un tournant sur tant d'aspects et le défi que représente une thèse est devenu encore un peu plus compliqué. Ce fut une épreuve que j'ai eu la chance de ne pas surmontée seule. A tous ceux qui furent là, merci.

A mon maitre de thèse, M. Courtois, merci de m'avoir accepté et accepté ce sujet si large, si flou mais qui me tenait à cœur, merci de vous être adapté à mon emploi du temps et d'avoir été si compréhensif.

A Mme. Dufourcq, merci d'avoir accepté d'être ma présidente de jury, comme je vous l'ai dit je ne serais pas allée jusqu'à cette étape sans votre soutien il y a plusieurs années.

A Laurence, merci de m'avoir laissé ma chance dans le stage le plus passionnant de mes longues études, un stage qui m'a inspiré cette thèse.

A Matthew Burbank, évaluateur préclinique à l'ANSM, merci pour ton temps et d'avoir répondu à mes questions, de m'avoir orientée et pour ta bienveillance.

A ma mère et mon père, qui ont dû endurer tant d'années d'études et de support pour une fille qui n'a jamais su choisir la facilité. Merci du soutien, pour l'amour et la patience. Merci maman pour ta force. Merci papa pour ton le dépassement de soi-même.

A Simone et Guy, papy et mamie, merci d'avoir été là, vous pouvez vous rassurer à présent. Et à Stéphane, qui m'a toujours conseillé et aidée quand j'en avais besoin.

A mon grand frère préféré, à celui qui m'a toujours protégée et qui me fait me sentir plus forte. A toi, et ta magnifique famille qui me donne de l'espoir. A Claire, Nesta, Naïs et Barry qui font de moi la tante la plus fière de l'hémisphère.

A Elodie, à celle pour qui les mots me manquent, parce que rien ne parle autant que tout ce qu'on fait au quotidien l'une pour l'autre. Parce que tu fus là, même au-delà du supportable.

Au groupe d'amis le plus dysfonctionnel et le plus exceptionnel qu'on ait jamais vu :

A Cassou pour être là, être toi, avoir toujours été le petit ange sur mon épaule.

A Paul, parce que tu es celui sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour, celui qui m'a toujours fait rire même dans la tragédie, celui avec qui tout devient spécial.

A Aude, à Bulle et à Mélo pour tous les fous rires, le soutien et toutes ces petites choses qui m'ont aidé à continuer. Vous n'imaginez pas ce que vous m'avez apportée.

A Virginie et à Fia, à celles que je ne vois pas assez et qui me manquent.

A Ismaël, mon grand Amour, chaque minute avec toi est une minute qui compte. Je n'ai que trop hâte de vivre chaque minute qui suivra à tes côtés.

Et aussi à ma famille, à ceux qui n'y croyaient plus, vous voyez ? Je l'ai fini ma thèse finalement !

1. Introduction	9
2. La mise sur le marché du médicament	12
a. Le cycle de vie du médicament	12
b. La recherche préclinique	13
c. Les essais toxicologiques pré-cliniques en vue de l'AMM	14
i. Toxicité aiguë	15
ii. Toxicité chronique	17
iii. Génotoxicité/Mutagénèse	19
iv. Cancérogénicité	22
v. Pharmaco(Toxico)cinétique et Pharmaco(Toxico)dynamie	25
vi. Reprotoxicité et toxicité du développement	28
vii. Effet sur la descendance	28
3. L'expérimentation animale	29
a. Historique	29
b. Réglementation européenne relative à l'expérimentation animale	32
i. La validation de chaque projet par un comité d'éthique	33
ii. Un personnel formé à manipuler les animaux	33
iii. Un lieu de vie et d'exploration adapté respectant le bien-être animal	33
iv. La mise en place au mieux des "3R"	34
c. Limites	37
i. Prédicativité	37
ii. Réglementation	37
4. Cadre des alternatives à l'expérimentation animale	39
a. Historique	39
b. Réglementations des méthodes alternatives dans le développement et l'autorisation des substances pharmaceutiques	42
c. Processus de validation des méthodes alternatives	43
d. Aspects pratiques de la conception et de la conduite d'études de validation	48
5. Les tests non animaux	52
a. Les techniques in vitro	52
i. Les tests cellulaires	53
ii. Les cultures cellulaire « classiques »	54
iii. Cultures cellulaires à deux et à trois dimensions (modèle 2D et modèle 3D)	59

iv.	Organoïdes et organe-sur-puce	64
b.	Omics, biopuces et exposome	70
c.	Les méthodes “ <i>in silico</i> ”	73
i.	La notion d’AOP (Adverse Outcome Pathway) :	73
ii.	L’intégration des méthode <i>in silico</i> dans le développement du futur médicament :	74
6.	Perspectives	82
a.	Les méthodes IATA	82
b.	Nouvelle vision des études précliniques	83
c.	Les essais précliniques et les Big Tech	87
7.	Conclusion	91
2.	Bibliographie :	94
3.	Annexes	106
	Annexe 1. Lignes directrices des essais toxicologiques	106
	Annexe 2. Annexe2 : Lignes directrices des essais toxicologiques de l’OCDE	107
	Annexe 3. Les prix Nobel ayant eu recours à l’expérimentation animale	5
	Annexe 4. Statistique de l’expérimentation animale en France en 2018	6
	Annexe 5. Exemple d’AOP tiré d’AOP-wiki	7
	Annexe 6. Test d’absorption cutanée d’après l’OCDE	8

Glossaire

Bioréacteur : appareil utilisé pour multiplier des micro-organismes pour la production de biomasse, la production de métabolites ou la bioconversion d'une molécule d'intérêt.

Endpoint : Point de mesure finale : valeur d'un critère atteinte lors l'achèvement du processus (ou de l'étape du processus) d'intérêt

Gènes orthologues : deux gènes sont dits orthologues s'ils remplissent les deux conditions suivantes :

1. Ils sont issus d'un ancêtre commun.
2. Ils ne sont pas le résultat d'une duplication génétique (copie accidentelle d'un gène).

Hits : molécule active identifiée par criblage

In chemico : utilisation de méthodes de réactivité chimique abiotique comme substituts d'essais (*in vivo*) sur des animaux

Modèle animal : Organisme animal utilisé pour représenter schématiquement un processus humain

Organotypique : Qui est conduit de façon à maintenir la cohésion entre les cellules et les tissus.

Phospholipidose : « La phospholipidose consiste en une accumulation excessive de phospholipides dans les tissus et un changement de la circulation cellulaire des phospholipides. C'est un phénomène toléré chez l'Homme à court terme, et présent à faible dose lors de l'utilisation de la plupart des médicaments. » (Définition d'après l'Institut Pasteur)

Quality by Design : Approche systématique du développement pharmaceutique qui se focalise sur la compréhension du produit et du procédé en se fondant sur la science et la gestion du risque qualité.

Screening : L'anglicisme *screening* désigne le criblage ou criblage à haut débit utilisé pour repérer les molécules potentiellement intéressantes. Le criblage à haut débit consiste à faire réagir simultanément un grand nombre de molécules différentes avec un substrat donné, en vue d'identifier en un minimum de temps, celles qui présentent une propriété recherchée.

Société de l'information : Etat de la société dans lequel les technologies de l'information et de la communication jouent un rôle fondamental.

SOP : Standard Operating Procedure : Procédure spécifique décrivant les activités nécessaires pour accomplir les tâches conformément aux règlements de l'industrie, aux lois et aux normes de l'organisation. Elle décrit le « comment faire ».

Liste des abréviations :

ADME : absorption, distribution, métabolisme et excrétion
AMM : autorisation de mise sur le marché
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de sante
AOP : *Adverse Outcome Pathway*
ATP : Acide désoxyribonucléique
BPL : bonnes pratiques de laboratoire
CAAT : Johns Hopkins University Center for Alternatives to Animal Testing
CEE : Communauté économique européenne
CHMP: Committee for Medicinal Products for Human Use (Comité des médicaments à usage humain de l'EMA)
CHO : Chinese Hamster Ovary
CI50: concentration inhibitrice médiane, concentration à laquelle un médicament est capable d'inhiber un processus biologique particulier de 50%.
CIRC: Centre International de Recherche sur le Cancer
CYP450 : cytochrome P450
ECHA : European Chemicals Agency (Agence européenne des produits chimiques)
Ecvam : European Center for Validation of Alternative Methods (Centre européen de validation des méthodes alternatives)
EDQM : European Directorate for the Quality of Medicines (direction européenne de la Qualité du Médicament et des Produits de Sante)
EMA: European Medicines Agency (Agence européenne du médicament)
EPA: Agence américaine de protection de l'environnement
EURL Ecvam : European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing
EU-Netval : European Union Network of Laboratories for the Validation of Alternative Methods
Gircor : Groupe de réflexion interprofessionnel sur la communication en recherche
IATA: *Integrated Approaches to Testing and Assessment*
ILAR: *Institute of Laboratory Animal Research*
IPS : *Induced Pluripotent Stem Cells* (cellules souches pluripotentes induites)
ISO : International Organization for Standardization
OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques
OMS : Organisation mondiale de la sante
OPESCT : Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques
PBPK: *Physiologically Based Pharmacokinetic modeling*
REACH: *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals* (Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques)
QSAR: *Quantitative Structure Activity Relationship*
NC3Rs : *National Center for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research*
NOAEL: *No Observable Adverse Effect Level* (Dose sans effet toxique observable)
PB/PK: *Physiologically Based Pharmacokinetic* (modèle mathématique)
SBEA : structure chargée du bien-être animal
SEURAT-1 : programme de recherche et développement pour le remplacement des toxicités répétées
SWP: Safety Working Party
UE : Union européenne

Liste des figures :

Figure 1 Cycle de vie du médicament tiré du Leem.....	12
Figure 2 Chronologie du développement d'un médicament.....	14
Figure 3 Détermination schématique de la DL50.....	15
Figure 4 Détermination des doses toxicologiques de référence	18
Figure 5 Tests de génotoxicité in vitro	20
Figure 6 Principe du test d'Ames - Source "Prévention du risque chimique" CNRS..	21
Figure 7 Résumé des exigences en matière d'essais et documents d'orientation pour l'évaluation de la génotoxicité dans l'UE d'après l'ICH S2 (32)	22
Figure 8 Visualisation schématique de la différence Pharmacocinétique/Pharmacodynamie	25
Figure 9 Exemple de modèles utilisés en Remplacement Relatif	36
Figure 10 Caricature du journal La Caricature M.e. V.e. Aubert (chez Aubert et Cie), 1850	40
Figure 11 Schématisation d'une méthode alternative	45
Figure 12 Etapes de la validation des méthodes alternative par l'EURL-ECVAM	48
Figure 13 Processus de validation d'une méthode alternative à l'expérimentation animale.....	51
Figure 14 Evolution du nombre de cellules en culture cellulaire au cours du temps..	56
Figure 15 Propriétés des cellules souches et différenciation	57
Figure 16 Différence schématique d'organisation entre les cultures cellulaires 2D et 3D (102)	60
Figure 17 Schéma de sphéroïdes couplés à la technologie microfluidique	61
Figure 18 Schéma de sphéroïdes sur micropuces (Spheroids on a chip) (105)	61
Figure 19 Schéma de corps embryoïdes.....	61
Figure 20 Schéma de sphéroïdes produits à partir d'une matrice	62
Figure 21 Synthèse des différentes techniques de cultures cellulaires abordées, par ordre de développement.....	64
Figure 22 Etapes de développement d'un organoïde de cerveau	66
Figure 23 Techniques de microfabrications	67
Figure 24 Dispositif microfluidique pour la culture 3D d'hépatocytes.....	68
Figure 25 Photographie d'un dispositif d'organe sur puce	69
Figure 26 Schéma du Body-on-chip de l'Institut Wyss.....	70
Figure 27 Différentes catégories des omiques	71
Figure 28 Spectrométrie appliquée à la métabolomique (131)	72
Figure 29 Construction d'un AOP	74
Figure 30 Schéma d'un modèle pharmacocinétique / pharmacodynamique : « PK/PD models »	75
Figure 31 Schéma d'un modèle pharmacocinétique physiologique : « PBPK model »	76
Figure 32 Schématisation du modèle QSAR	77
Figure 33 Modèle de QSAR 3D	78
Figure 34 Modélisation PBPK chez la souris (143).....	80
Figure 35 Deformable Cell Model (146).....	81
Figure 36 Simulations numériques de la toxicité in vitro et in vivo (132)	81

Figure 37 Stratégie IATA basé sur l'AOP	83
Figure 38 Modèle de Barker	85
Figure 39 Modèle de Paul.....	87
Figure 40 Filiales "santé" des Big Tech	88
Figure 41 Evolution des stratégies alternatives	93
Figure 43 Etapes du test d'absorption cutané	9

Liste des tableaux

Tableau 1 Durée et cout du développement d'un médicament tiré du Leem.....	13
Tableau 2 Comparatif entre les cultutres cellulaires 2D et 3D	63
Tableau 3 Synthèse des avantages et limites des méthodes alternatives.....	92

1. Introduction

L'objectif principal de l'industrie pharmaceutique est de créer de nouvelles thérapies pour répondre aux besoins médicaux non satisfaits. À ce jour, cette mission a impliqué l'utilisation de nombreux animaux de diverses espèces dans une grande variété de modèles et de paradigmes de test.

En parallèle, l'utilisation d'animaux dans la recherche est de plus en plus surveillée par le public. Alors que la communauté se préoccupant des droits des animaux a depuis longtemps remis en cause la valeur des études précliniques pour prédire la santé humaine, une remise en question plus sérieuse de la valeur des études animales s'est posée au sein même de la communauté scientifique (1–3). Le manque de concordance des résultats de certains essais cliniques avec ceux déterminés en préclinique a ainsi conduit à une réexamination des méthodes d'études sur les animaux (4,5). De plus, le manque de concordance entre les données d'efficacité sur l'animal et les résultats des essais sur l'homme a conduit à s'interroger sur le rôle fondamental que les études animales ont joué dans l'arène préclinique pour certains domaines thérapeutiques (6,7). Plusieurs publications importantes pointent les faiblesses de transposition des modèles animaux(8,9), ainsi qu'un nombre croissant d'articles qui remettent en cause la qualité des données d'études *in vivo* (4,10–13). Cette combinaison de facteurs a conduit à une tempête de controverses autour de la valeur des études animales en général(14–16).

Plusieurs études largement diffusées ont rapporté une concordance limitée entre les expériences animales avec les essais cliniques humains ultérieurs (moins de 8% de réussite dans la transposition des essais précliniques d'anti-cancéreux (17)). Des évaluations récentes de la qualité des études sur les animaux ont suggéré que cet échec traductionnel pourrait être dû en partie à des lacunes dans la planification, la conduite et la communication des études *in vivo*.

La dernière décennie a pourtant vu de nombreux progrès à travers le perfectionnement et la mise au point de nouvelles méthodes d'utilisation des animaux dans la découverte et le développement de médicaments. Celles-ci incluent notamment les progrès en imagerie non invasive, la surveillance télémétrique des animaux, les méthodes de micro-échantillonnage et l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés. D'une manière générale, la tendance est de maximiser les informations obtenues pour chaque test en utilisant de moins en moins d'animaux, notamment grâce à une complexité toujours croissante des modèles utilisés et l'affinement des protocoles expérimentaux.

Ces progrès dans le domaine des études précliniques ont été possibles par la conjonction d'avancées technologiques et expérimentales dans la simulation informatique (*in silico*), *in vitro* et *in vivo*, seules et en combinaison. Mais ils sont rendus possibles également par le durcissement des réglementations qui exigent une exemplarité dans l'utilisation des animaux et soutiennent dans le même temps le développement d'approches non animales. Cependant il existe peu d'accords internationaux pour l'harmonisation des « bonnes pratiques » de l'expérimentation animale. En outre, les grandes entreprises pharmaceutiques travaillent généralement sur un plan international en combinant une R&D interne avec des collaborations universitaires, industrielles et

gouvernementales et un travail en partenariat avec une myriade d'organismes de recherche sous contrat. Les animaux sont donc soignés et utilisés dans un environnement hautement réglementé, mais dont les conditions varient selon les divergences réglementaires locales, elles-mêmes fondées sur une variété de cadres juridiques et réglementaires, ainsi que des différences culturelles, religieuses ou politiques.

L'augmentation significative de la mondialisation et de l'externalisation des activités de découverte a abouti à de plus en plus de collaborations universitaires et inter sociétés, ainsi qu'à une augmentation des partenariats public-privé. L'industrie pharmaceutique a reconnu l'importance de travailler ensemble dans l'espace préconcurrentiel pour faire progresser le partage des connaissances avec des modèles animaux, ainsi que la possibilité de travailler au-delà des frontières pour faire progresser la science translationnelle. La coopération et le soutien de l'industrie avec le *National Center for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* (NC3Rs) au Royaume-Uni et la table ronde de *l'Institute of Laboratory Animal Research* (ILAR) aux États-Unis en sont des exemples.

Les modèles animaux se sont imposés comme un outil prédominant de la prise de décision dans le passage d'un candidat-médicament des études précliniques aux phases cliniques. Au cours des dernières années, la forte dépendance du processus de découverte et de développement pharmaceutique à l'utilisation de modèles animaux a fait l'objet d'un examen de plus en plus minutieux pour des raisons éthiques et scientifiques. En parallèle, nous arrivons maintenant à un tournant, où le changement de paradigme dans l'évaluation de la sécurité des tests sur les animaux aux méthodes non animales est à de plus en plus d'actualité. En dehors de l'Union Européenne (UE), cela est illustré par l'Agence américaine de protection de l'environnement (EPA) qui a l'intention de refuser les demandes d'études sur les mammifères 2035. (18)

Des investissements et des progrès substantiels ont été réalisés jusqu'à présent dans la recherche sur les approches non animales et leur utilisation dans les cadres réglementaires actuels notamment dans l'UE. Un certain nombre d'autres développements ont également soutenu ce processus (par exemple le National Research Council en 2007 dans "*Vision and strategy for toxicity testing in the 21st century*").

Cette vision est soutenue par trois facteurs interdépendants et synergiques :

- les développements scientifiques et techniques menant à une meilleure compréhension de la biologie expliquant la façon dont les substances médicamenteuses ont des effets néfastes sur la santé humaine,
- l'augmentation de l'accès aux nouveaux outils et techniques générant une grande quantité de nouvelles données sans recours à l'expérimentation animale,
- les progrès dans les approches d'intégration de preuves provenant de sources disparates afin d'en tirer des conclusions pour l'évaluation réglementaire.

Les alternatives à l'expérimentation animale sont-elles, seules, une solution acceptable pour prédire la toxicologie humaine ? Cette thèse ne pouvant traiter d'un sujet si vaste, je me concentrerai sur les études précliniques des médicaments à usage humain (comme définis et réglementés par les articles L5121-1 à L5127-6 du CSP) (19)

Dans une première partie, je reviendrai sur la mise sur le marché d'un médicament et les essais sur les animaux réalisés réglementaires des phases précliniques.

Dans un second temps, je développerai les avancées scientifiques qui représentent autant de nouveaux (et moins nouveaux) modèles non animaux pour les essais précliniques.

Enfin je reviendrai sur les perspectives qu'impliquent le développement de ces technologies non animales.

Selon Michael Balls dans "*The History of Alternative Test Methods in Toxicology*", il existe deux raisons principales expliquant le besoin de chercher à remplacer les tests de toxicité sur les animaux : l'inadéquation insurmontable des animaux comme modèles de l'Homme et les avantages offerts par l'utilisation de tests et de stratégies alternatives à l'expérimentation animale scientifiquement poussées.

2. La mise sur le marché du médicament

a. Le cycle de vie du médicament

Le développement d'un médicament prend en moyenne une dizaine à une quinzaine d'années de la fin de la recherche fondamentale (la validation de l'hypothèse scientifique) à la mise sur le marché (20). On divise habituellement le cycle de vie d'un médicament en 5 étapes (Figure 1). La recherche exploratoire, la phase préclinique puis la phase clinique sont autant de filtres permettant de sélectionner la molécule et la forme d'intérêt pour le futur médicament. Viennent ensuite les étapes de procédures administratives (demande d'autorisation de mise sur le marché -ou AMM-, détermination des prix et du remboursement) et post-AMM (phases de commercialisation et de pharmacovigilance). Les différents filtres ont pour objectifs d'assurer la qualité, la sécurité et l'efficacité qu'exige l'AMM (Tableau 1).

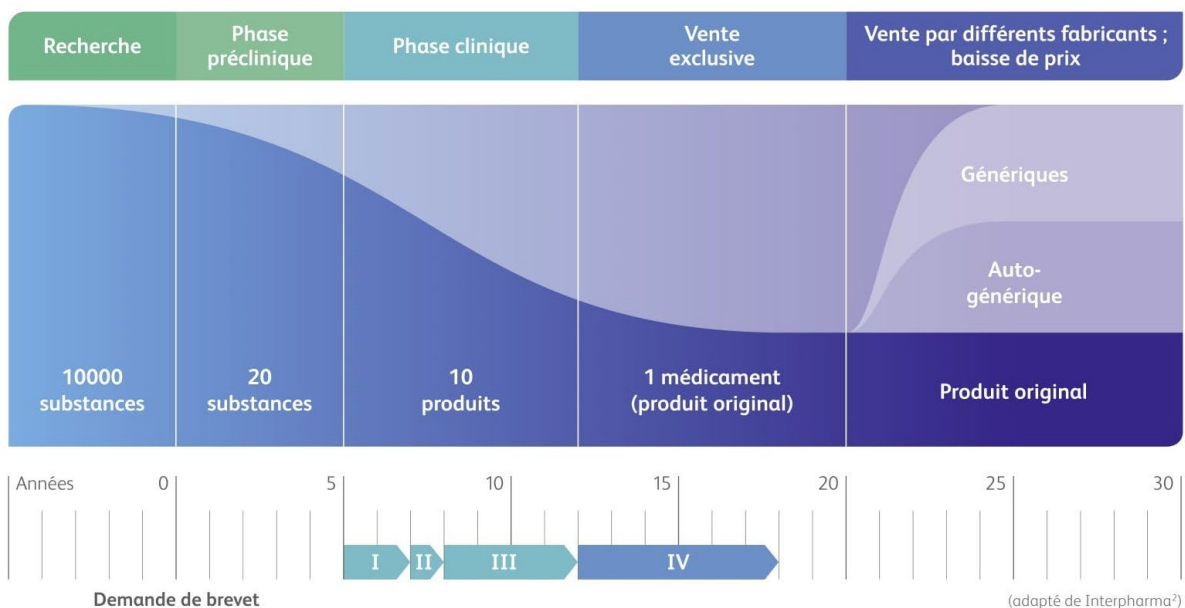


Figure 1 Cycle de vie du médicament tiré du Leem

La phase préclinique est le dernier filtre avant le passage au modèle humain et utilise traditionnellement les essais sur les animaux. L'expérimentation animale (aussi appelée recherche animale ou test *in vivo*) désigne l'utilisation d'animaux non humains dans des expériences. Actuellement, tous les nouveaux principes actifs doivent être soumis à des tests rigoureux sur les animaux (1).

Lorsque l'on s'intéresse à l'efficacité du filtre de chaque étape, on observe pourtant que c'est la phase 2 qui représente l'étape la plus discriminante. En effet les essais précliniques sont non seulement l'étape la moins longue (0,8 ans en moyenne) mais aussi celle pour laquelle les coûts engagés sont les plus faibles après l'accès au marché (Tableau 1).(21)

Tableau 1 Durée et cout du développement d'un médicament tiré du Leem

39 LE MÉDICAMENT EST LE FRUIT D'UN LONG, RISQUÉ ET COÛTEUX PARCOURS DE R&D

Source : "The R&D Cost of a New Medicine", Jorge Mestre-Ferrandiz, Jon Sussex and Adrian Towse, OHE, décembre 2012

	Recherche	Préclinique	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Accès	TOTAL
Durée (années)	3,9	0,8	1,3	2,2	2,4	0,9	11,5 ans
Probabilité ¹	-	70%	63%	31%	63%	87%	7%
Coûts engagés par NEM ² en M\$	76,54	86,8	149,5	316,9	235,9	33,3	899 M\$
Coûts capitalisés par NEM ³ en M\$	207,4	184,1	284	501,6	293,8	34,9	1 506 M\$

1- Probabilité de passer d'une étape à la suivante / 2- Coûts engagés pour lancer une NEM (nouvelle entité moléculaire) / 3- Coûts prenant en compte le coût du capital immobilisé sur la base d'une valorisation à 11% / Coûts calculés sur la base d'une moyenne car non identifiables par molécule.

b. La recherche préclinique

Ces tests d'innocuité fournissent des informations cruciales pour la planification des essais sur l'Homme.

L'objectif de la recherche préclinique est d'évaluer le comportement qu'auront les médicaments candidats chez l'Homme. Pour cela, on réalise des essais *in vivo*, c'est-à-dire sur des organismes vivants non humains. Les organismes les plus courants sont les rongeurs : souris ou rats. Il s'agit à la fois d'une obligation scientifique et d'une obligation légale pour permettre de simuler la complexité de la physiologie humaine. Ils doivent :

- Évaluer le mécanisme d'action du médicament-candidat et évaluer son activité (pharmacologie),
- Décrire son comportement et le devenir de la substance dans un organisme vivant (pharmacocinétique),
- Déterminez le degré de toxicité. Habituellement, un brevet est appliqué à ce stade pour protéger la découverte.

Ces données sont obligatoires pour constituer le dossier de demande de commercialisation. Elles permettent d'estimer la dose à administrer chez l'homme en convertissant en « équivalent-homme » la dose maximum sans effet toxique chez l'animal.

Les tests de sécurité commencent tôt dans le développement d'un potentiel médicament avec des tests de toxicité aiguë. Des études de toxicité plus longues sont réalisées pour préparer les études cliniques, en gardant à l'esprit les exigences d'homologation du médicament. Il s'agit généralement d'études de 30 jours, suivies d'études de toxicité de six mois (Figure 2).

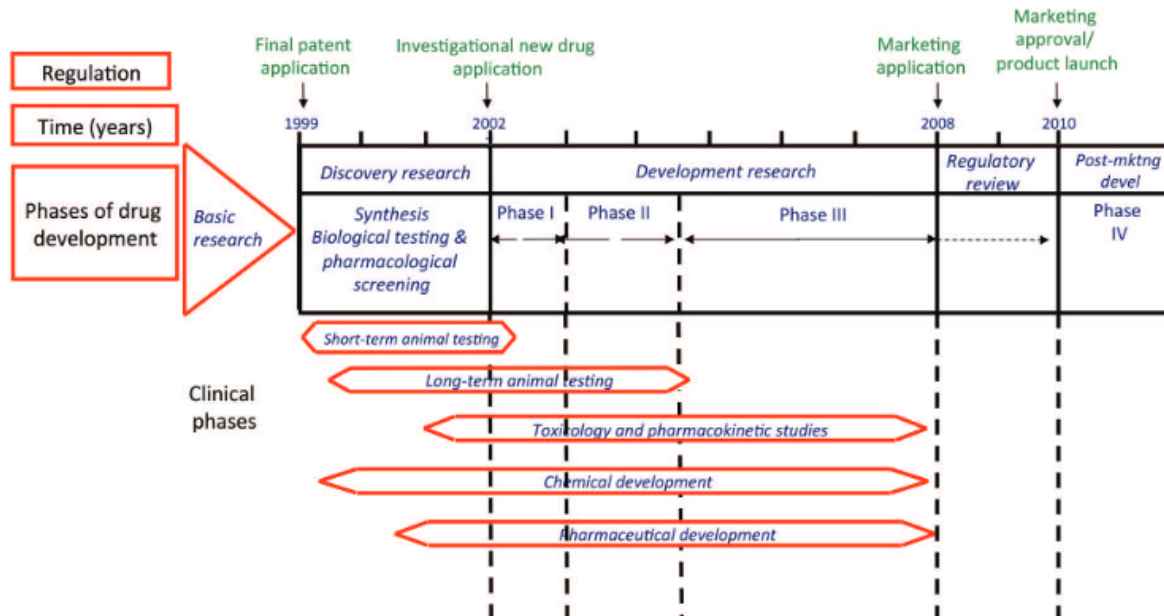


Figure 2 Chronologie du développement d'un médicament

Les candidats-médicaments continuent d'être testés sur des animaux tout au long du processus d'essai clinique : les données d'études humaines sont utilisées pour informer et affiner les études animales afin qu'elles révèlent des données plus utiles et plus précises. (21) Les tests d'innocuité peuvent aussi faire appel à un certain nombre de méthodes « alternatives », mais, malheureusement seulement une vingtaine de ces méthodes sont validées au niveau européen. C'est pourquoi dans cette partie, je traiterai principalement les essais d'innocuité « historiques », donc sur les animaux.

Traditionnellement, les essais précliniques utilisent trois espèces animales différentes pour tester le futur médicament. La réglementation demande que les tests soient réalisés sur une espèce de rongeur et une espèce de non rongeur. Ces études sont très encadrées et exigent un effort pour réduire l'utilisation d'animaux, ou, à défaut, de porter un soin particulier à leurs conditions. Entre 1984 et 1999, le nombre d'animaux utilisés pour le développement de médicaments a diminué de moitié et reste stable depuis. De nouveaux modèles, que ce soit des cellules en culture ou des programmes informatiques simulant les effets thérapeutiques (ou toxique) sur des cibles données, permettront de réduire encore le recours aux animaux dans les années à venir, ou de renoncer à certaines pratiques invasives. Malgré tous les efforts mis en place, l'utilisation d'animaux en recherche préclinique reste incontournable pour accéder aux essais cliniques (les premiers tests sur l'Homme).

c. Les essais toxicologiques pré-cliniques en vue de l'AMM

L'évaluation de la sécurité des médicaments dans l'UE est basée sur des décennies de pratique, utilisant principalement des études de toxicité animale pour modéliser les effets toxiques chez l'homme. Toutes ces études doivent être effectuées conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire.

Dans la partie suivante, nous verrons les différents essais classiquement réalisés pour des médicaments pris per os (par voie orale) ainsi que les différentes initiatives alternatives, validées ou non par l'EURL ECVAM¹ (Annexe 1).

i. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë est généralement le premier essai réalisé lors des phases précliniques. Il consiste en l'administration d'une dose unique chez un animal pour déterminer les doses toxiques et les organes particulièrement ciblés. Ils reposent sur une évaluation des effets toxiques généraux d'une dose unique (ou de doses multiples) d'une substance active dans les 24 heures par une voie spécifique (orale, cutanée, inhalation, etc...). L'analyse se porte sur les effets qui se produisent au cours d'une observation courte, de 14 à 21 jours en général.

Cette étape permet de déterminer :

- La DL50 (Figure 3) : dose létale tuant la moitié des animaux ; à noter que la détermination de cette DL50 n'est plus obligatoire depuis 1991.

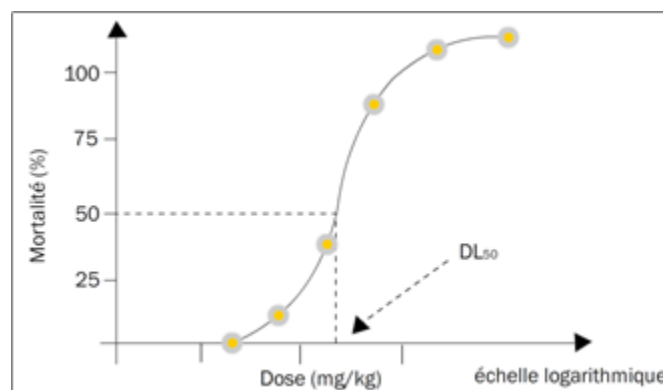


Figure 3 Détermination schématique de la DL50

- La dose maximale tolérée : dose minimale à partir de laquelle apparaît un effet toxique mais qui n'affecte pas la survie des animaux.
- La dose maximale sans effet toxique.

¹ L'EURL ECVAM (anciennement ECVAM) est le laboratoire de référence européen pour la validation des méthodes alternatives.

La réalisation des essais de toxicité aiguë est définie dans la directive ICH² M3 (R2) « *Directive sur les études d'innocuité non cliniques requises pour les études cliniques chez l'humain et Les autorisations de mise en marché de produits pharmaceutiques* » et la méthode est décrite dans des lignes directives de l'OCDE.

Une dérogation de l'OCDE existe pour la toxicité aiguë (OCDE GD 237) et inclut, entre autres critères, la possibilité de déroger à l'étude de toxicité aiguë par voie orale sur la base des résultats d'un autre test ou d'une batterie de tests, si la DL50 prévue est supérieure à 2000 mg/kg.

En pratique, les essais de toxicité aiguë perdent de l'importance et sont réalisés en même temps que les premières étapes de la toxicité chronique.

Le test CFU-GM pour Colony Forming-Unit Granulocyte/Macrophage est utilisé pour prédire la neutropénie aiguë chez l'homme et comme outil de prédiction des myélosuppressions chimiquement induite. Le potentiel hématotoxique des xénobiotiques est déterminé par l'évaluation de l'inhibition des CFU-GM (22,23). Il a été intégré dans le projet européen intégré ACuteTox³ comme potentiel outil prédictif de la toxicité aiguë par voie orale (24). Ce test est à l'étape de prévalidation dans le processus de l'EURL ECVAM (Figure 12).

Le test Neutral Red Uptake (NRU) est utilisé pour estimer les doses de départ pour les tests de toxicité systémique orale aiguë et détermine la cytotoxicité *in vitro* pour prédire les DL50 *in vivo* chez les rongeurs. Le rouge neutre (3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénazine hydrochloride) est un colorant vital connu depuis le XIX^{ème} siècle, mais ce n'est que dans les années 80 que le test d'évaluation de la toxicité a été développé. (25,26)

Le rouge neutre est un colorant faiblement cationique qui prend une teinte jaune-orangée en milieu basique et vire au rouge en milieu acide. C'est donc un très bon marqueur des lysosomes (très acides). Or dans une cellule le colorant pénètre la membrane plasmique par diffusion passive puis se concentre dans les lysosomes où il se

² Le **Conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain** (CIH ou ICH en anglais) est une structure internationale qui rassemble les autorités de réglementation et les représentants de l'industrie pharmaceutique d'Europe, du Japon et des États-Unis pour discuter des aspects scientifiques et techniques de l'enregistrement des médicaments.

³ Le projet ACuteTox a représenté la première tentative de créer une stratégie de test intégrée basée uniquement sur des méthodes *in vitro* et *in silico*, dans le but ultime de remplacer les tests sur les animaux pour prédire la toxicité systémique orale aiguë humaine et la classification des produits chimiques.

Les principaux objectifs du projet comprenaient la compilation, l'évaluation et la production de données *in vitro* et *in vivo* de haute qualité pour des analyses comparatives et l'identification des facteurs qui influencent la corrélation entre la toxicité *in vitro* (concentration) et *in vivo* (dose), en particulier en prenant en considération de la cinétique, du métabolisme et de la toxicité pour les organes (foie, système nerveux central, rein).

retrouve piégé. Il finit par s'associer par des liaisons hydrophobes électrostatiques à la matrice lysosomale. Le pH lysosomal est maintenu par une pompe à protons ATP-dépendante. Au bout de 2 à 3 heures, la coloration a atteint son maximum : on peut alors établir un lien entre l'absorbance à 540 nm et le nombre de cellules viables. Une coloration différentielle des lysosomes sera donc le signe d'une cellule viable, avec des pompes à protons effectives, et une coloration diffuse indiquera que la cellule a perdu son homéostasie.

Le test 3T3-NRU est retenu pour le suivi de la toxicité des agents chimiques qui ne nécessite pas la classification de toxicité aiguë ($DL_{50} > 2000$ mg/kg de poids corporel), notamment les phototoxiques. Ce test a été validé par l'EURL ECVAM (Figure 12). Cependant l'ECHA recommande de n'utiliser le 3T3-NRU qu'en stratégie intégrée, c'est à dire couplée à d'autres méthodes.

ii. Toxicité chronique

La toxicité chronique regroupe les effets toxicologiques généraux d'une substance lors d'une exposition quotidienne à dose répétée. Elle dépend de l'aptitude de la substance active à s'accumuler dans les tissus et ces essais renseignent sur quels organes souffrent électivement de cette toxicité.

Le test doit être réalisé sur plusieurs modèles animaux, au minimum dans une espèce rongeur -souvent le rat- et une espèce non rongeur (généralement le chien ou le singe).

Lorsqu'elle est connue, la voie d'administration utilisée sera si possible celle choisie pour l'administration à l'Homme. L'administration de la substance médicamenteuse est quotidienne ou biquotidienne à trois niveaux de doses (forte, moyenne et faible) sur une durée adaptée. En effet, cette durée dépendra de l'indication chez l'homme : le médicament sera-t-il administré sur une courte durée ou sera-t-il un traitement chronique à prendre quotidiennement. En général on distingue les essais de toxicité sub-chronique qui durent de 1 à 3 mois et les essais de toxicité chronique qui durent 6 mois.

Ces études communiquent des informations :

- Sur les caractéristiques générales de la toxicité,
- Les organes cibles de la toxicité,
- Le lien dose-réponse de chaque type de toxicité
- La réaction de l'organisme aux métabolites formés,
- Les réponses retardées,
- Les effets cumulatifs,
- La marge entre la dose toxique et non toxique,
- L'information sur la réversibilité ou l'irréversibilité de l'effet,

Pour définir la toxicité (Figure 4), on détermine les doses NOAEL (*no observed adverse effect level*) -la dose jusqu'à laquelle on n'observe aucun effet délétère-, NOEL (*No Observed Effect Level*) – la dose à partir de laquelle on commence à observer l'effet recherché-.

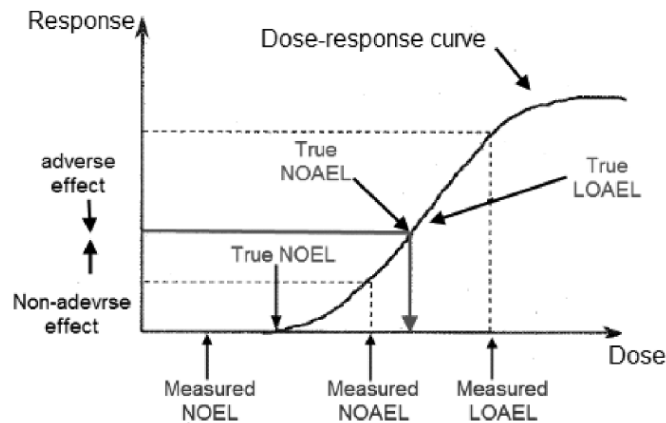


Figure 4 Détermination des doses toxicologiques de référence

Des méthodes de détermination de la toxicité chronique ne nécessitant pas de tests animaux sont en cours de développement, on peut notamment citer :

- L'initiative Predictomics pour modéliser spécifiquement la toxicité rénale et hépatique dans un premier temps se basant exclusivement sur un cloud et des données issues des omiques,
- Seurat-1 (*Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing*), un projet de recherche européen regroupant 6 projets et différentes approches pour modéliser la toxicité chronique (27)

Cette initiative est financée à hauteur de 50 millions d'euros. Elle est cofinancée par l'Union Européenne et l'industrie cosmétique (Cosmetics Europe⁴) et se concentre sur la compréhension mécanistique des effets toxiques. Quatre principaux modèles sont utilisés : NOTOX (modèles *in silico* dérivés de cultures organotypiques), Scr&Tox (développement de tests cellulaires sur des cellules souches pluripotentes), HemiBio (bioréacteur de cellules hépatiques couplé à un dispositif microfluidique), COSMOS (modèles *in silico* pour la cosmétique) et DETECTIVE (utilisation des méthodes omiques pour la détection de biomarqueurs).

Ce projet a été arrêté en 2016.

- Predict-IV. Le but de Predict-IV est de développer une stratégie d'essais toxicologiques intégrant différentes techniques *in vitro* à partir des connaissances

⁴ Cosmetics Europe est l'association professionnelle européenne de l'industrie des cosmétiques regroupant des industries cosmétiques et de soins et des associations représentant cette industrie au niveau national, dans toute l'Europe.

de la biologie cellulaire, des mécanismes de la toxicité et de la modélisation *in silico* (pharmacocinétique).(28)

- EU-ToxRisk (29) est un projet de réflexion sur la toxicologie. Il promeut une toxicologie basée sur les réponses des cellules humaines et la compréhension mécanistique complète des relations de cause à conséquence des effets chimiques nocifs.

Ces initiatives n'ont cependant à ce jour pas encore été validées.

iii. Génotoxicité/Mutagénèse

Le risque mutagène d'un médicament consiste en l'altération du génome, c'est-à-dire de l'ADN (acide désoxyribonucléique). Une mutation consiste en un changement dans une séquence des nucléotides d'une partie du génome. La mutation peut être silencieuse (c'est-à-dire sans conséquence) ou accompagnée d'un ou plusieurs effets. Si la mutation touche le génome des cellules germinales, la mutation est transmissible aux générations suivantes.

La mutagénèse a pour objectif de détecter d'éventuelles modifications du matériel génétique induites par le médicament (on parle d'effet mutagène ou clastogène). Les altérations génétiques des cellules somatiques et germinales sont associées à des effets graves sur la santé, qui peuvent en principe se produire même à de faibles niveaux d'exposition.

Les mutations dans les cellules somatiques peuvent provoquer un cancer si elles surviennent dans les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur et/ou les gènes de réponse aux dommages à l'ADN, et sont responsables de diverses maladies génétiques.

Il a également été proposé que l'accumulation de dommages à l'ADN dans les cellules somatiques joue un rôle dans des conditions dégénératives telles que le vieillissement accéléré, le dysfonctionnement immunitaire, les maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives.

Les mutations dans les cellules germinales peuvent entraîner des avortements spontanés, une infertilité ou des dommages héréditaires à la progéniture et éventuellement aux générations suivantes.

La recherche de mutations est effectuée dans le cadre de la toxicologie génétique et représente une composante importante de l'évaluation de la sécurité des substances, c'est pourquoi on retrouve de nombreux essais validés *in vivo* et *in vitro* (Figure 7, Annexe 1 et 2) :

- Les essais *in vitro* standard comprennent (Figure 5) :
 - L'analyse de mutation inverse bactérienne ou test d'Ames (TG 471 de l'OCDE),
 - Le test d'aberration chromosomique des mammifères *in vitro* (TG 473 de l'OCDE),

- Le test de mutation du gène cellulaire mammifère *in vitro* (TG 476 de l'OCDE [Hprt] et TG 490 [MLA/tk]),
- Le test de micronoyaux cellulaire mammifère *in vitro* (OCDE TG 487).
- À l'heure actuelle, les tests *in vivo* les plus couramment utilisés sont :
 - Le test de micronoyaux des érythrocytes mammifères (TG 474 de l'OCDE),
 - Le test d'aberration chromosomique de la moelle osseuse mammifère (OCDE TG 475),
 - L'essai de mutation somatique et germinale des rongeurs transgéniques (TG 488 de l'OCDE)
 - Et l'essai *in vivo* de comète alcaline mammifère (OCDE TG 489).

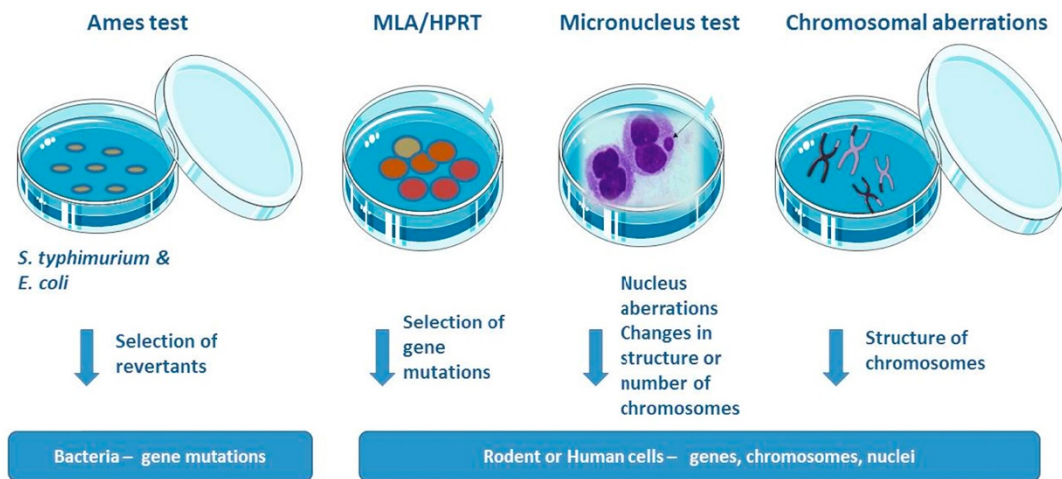


Figure 5 Tests de génotoxicité *in vitro*

Généralement les tests réalisés sont les suivants :

- 1 test de mutation génique, généralement le test d'Ames (Figure 5 et 6)

Les tests d'Ames consistent à déterminer la capacité d'une substance chimique ou d'un agent physique à induire des mutations chez différentes souches de la bactérie *Salmonella typhimurium*. Les souches utilisées sont porteuses d'une mutation sur l'un des gènes de la synthèse de l'acide aminé histidine (His). Lorsque cette mutation **His⁻** est présente, les souches sont incapables de pousser sur un milieu sans histidine. Avec une fréquence très faible, ces bactéries **His⁻** mutent spontanément vers de **His⁺** (on les appelle les révertants). Ces souches ayant muté retrouvent leur capacité à pousser sur un milieu dépourvu d'histidine. Cette fréquence de réversion peut augmenter en exposant les bactéries **His⁻** à des agents mutagènes. Ainsi, le test d'Ames permet de quantifier l'induction de ces mutations réverses **His⁺**.(30)

Le succès du test d'Ames vient de sa simplicité d'exécution et de son coût modique. De plus, ce test est rapide (il ne prend que 48h). Sa sensibilité (cancérogènes qui sont mutagènes) est de 40-50%. Son pouvoir prédictif (mutagènes qui sont cancérogènes)

est de 70-90% selon les études. Il donne une réponse quantitative permettant des études comparatives. Par sa simplicité et son faible coût de revient, le test d'Ames est le plus utilisé des tests de Toxicologie Génétique. Parmi tous les tests disponibles, sa banque de données est certainement la plus importante. Enfin, il a été validé dans de nombreux pays.

Cependant, le test d'Ames est un test bactérien. Il représente une simulation approximative de ce qui peut se passer chez l'Homme. Il existe des différences de métabolisme, de système de réparation de l'ADN, de systèmes de détoxification, de conditions d'exposition et de diffusion des substances dans l'organisme cible à prendre en compte en l'Homme et la bactérie. De plus la présence d'histidine dans certains échantillons biologiques peut induire de fausses réponses positives et certains bactéricides (antibiotiques) peuvent induire des fausses réponses négatives.

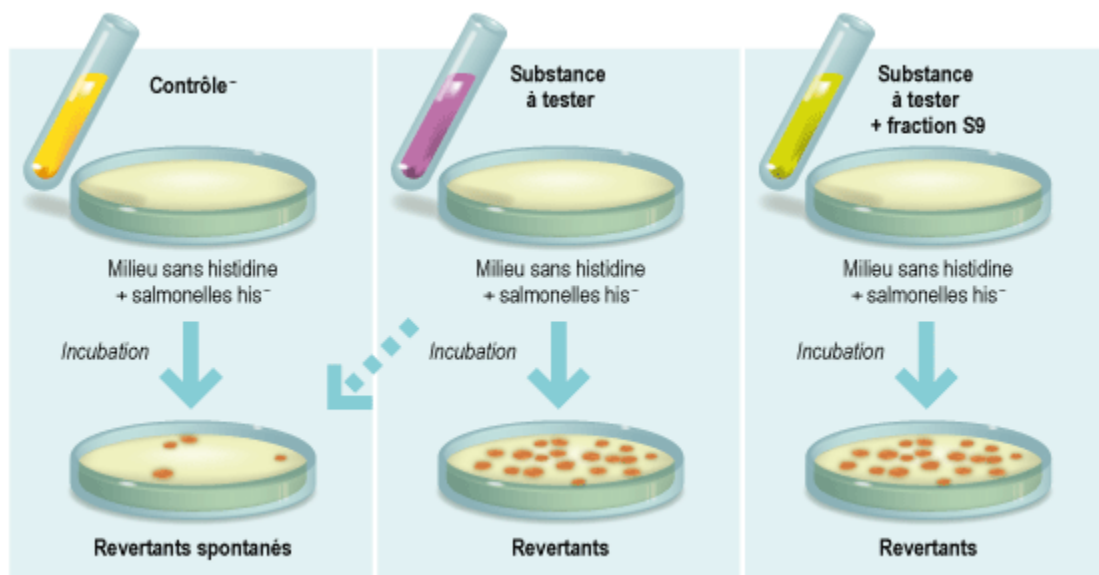


Figure 6 Principe du test d'Ames - Source "Prévention du risque chimique" CNRS

- 1 test d'aberration chromosomique *in vitro* sur cellules de mammifères. (Figure 5)
- 1 test d'aberration chromosomique *in vivo* sur cellules hématopoïétiques de rongeur (rats ou souris).

Les tests doivent être adaptés à chaque spécificité de médicaments testés (antibiotiques, composés non absorbés...).

La réglementation ICH S2 (R1) (Figure 7) concernant les substances pharmaceutiques exige que les tests *in vitro* soient toujours suivis des tests *in vivo* car les essais *in vitro* ne peuvent actuellement pas être considérées comme remplaçant entièrement les tests sur les animaux.(31) L'une des raisons est que les méthodes *in vitro*, tout en ayant une sensibilité élevée (et donc un faible taux de faux négatifs), ont une spécificité relativement faible et donc un taux élevé de résultats faux positifs.

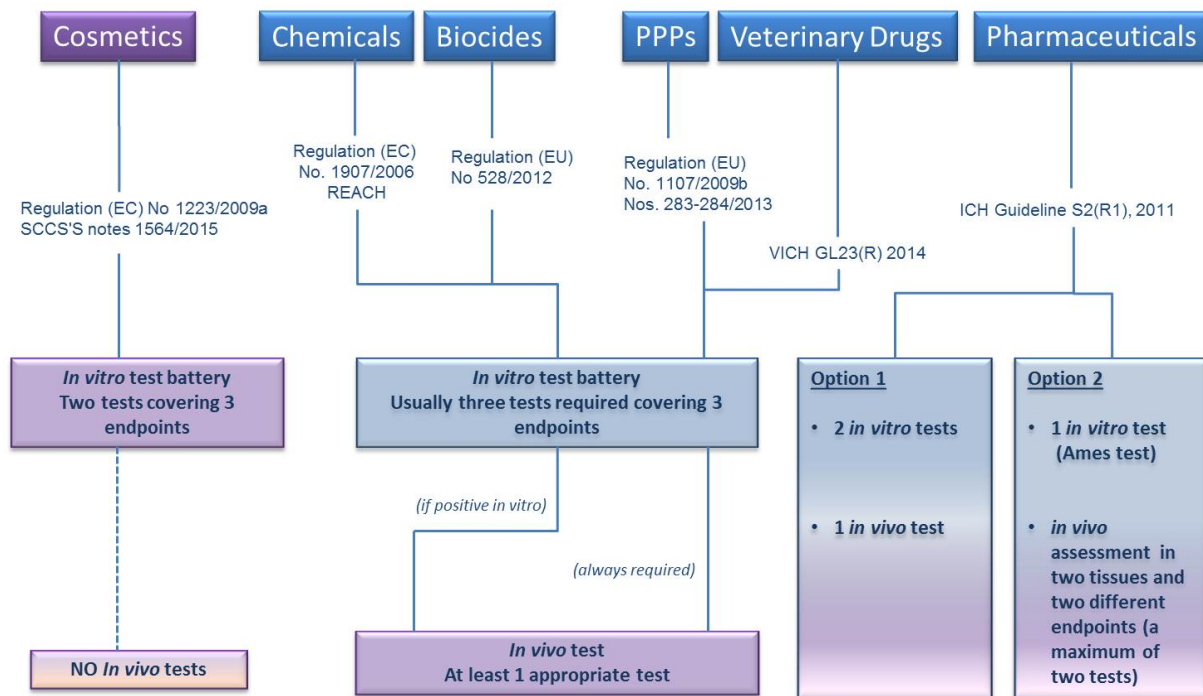


Figure 7 Résumé des exigences en matière d'essais et documents d'orientation pour l'évaluation de la génotoxicité dans l'UE d'après l'ICH S2 (32)

iv. Cancérogénicité

Les substances sont définies comme cancérogènes si, après inhalation, ingestion, application cutanée ou injection, elles induisent des tumeurs malignes, augmentent leur incidence ou leur malignité ou raccourcissent le temps d'apparition de la tumeur.

La carcinogenèse est un processus multi-étape complexe qui implique la transition des cellules normales en cellules cancéreuses. Elle est fortement influencée par des facteurs tels que la génétique, l'âge, l'alimentation, l'environnement, l'équilibre hormonal, etc.

Ces études peuvent être menées en parallèle des études de première administration à l'Homme sauf exception (par exemple si les tests de mutagenèse reviennent positifs).

Les essais se font par administration sur une longue durée de la substance pharmaceutique étudiée (2 ans ou plus) sur des animaux mâles et femelles de deux espèces (généralement rat et souris) avec 3 niveaux de doses.

Cette recherche est surtout importante pour les médicaments utilisés pendant de longues durées de traitement. C'est donc une donnée essentielle face à l'augmentation croissante des maladies chroniques (en France, cela représente 10 millions de personnes soit 1 français sur 6 et devrait augmenter à 20 millions d'ici 2030) (32).

De plus les résultats doivent prendre en compte la pathologie traitée : les anticancéreux eux-mêmes et les immunodépresseurs peuvent favoriser l'apparition de cancers.

La voie d'administration sera identique à celle utilisée en clinique et l'exposition à la substance est vérifiée par des mesures répétées de concentration plasmatique.

Les cancérigènes génotoxiques ont la capacité d'interagir avec l'ADN. Ils affectent ainsi l'intégrité du génome, tandis que les cancérigènes non génotoxiques exercent leurs effets cancérigènes par d'autres mécanismes qui n'impliquent pas d'altérations directes de l'ADN (31).

Ces études sont extrêmement gourmandes en temps et en ressources et la charge animale élevée a soulevé des préoccupations éthiques (33). Alors que les tests de génotoxicité *in vitro* et *in vivo* contribuent à l'évaluation des cancérigènes génotoxiques, il y a un manque de tests disponibles pour l'évaluation des cancérigènes non génotoxiques. Pour toutes ces raisons, il existe une forte demande de stratégies et de méthodes alternatives dans ce domaine.

Dans l'ICH S1 (2012) et la Directive 91/414/CEE, l'évaluation de la cancérigénicité est réalisée l'étude (ou l'étude combinée) de toxicité chronique et de cancérigénèse sur deux espèces : le rat et la souris, tout au long de leur vie (2 ans et 18 mois respectivement). Ces études sont décrites dans la directive de l'451-3. Une attention très particulière doit être portée sur les « témoins historiques », l'éventuel cumul des incidences tumorales et les critères de qualité des études expérimentales (avec par exemple le score de Klimisch⁵). Les essais peuvent aussi être réalisés sur modèles animaux transgéniques lorsque traitement sera pris en continue par le patient pendant au moins 6 mois ou s'il est intermittent mais pour une affection chronique ou récurrente.

Tests de transformation cellulaire

Les tests de transformation cellulaire *in vitro* (CTA) modélisent étroitement certaines étapes clés du processus de carcinogénèse *in vivo* et sont utilisés depuis plus de quarante ans pour dépister la cancérigénicité potentielle et étudier les mécanismes de cancérigénicité. Traditionnellement, le test de formation de colonie en agar mou a été utilisé pour surveiller la transformation cellulaire et l'ancrage, avec un comptage manuel des cellules proliférées après 3-4 semaines de croissance cellulaire.

Les CTA sont considérés comme fournissant des informations supplémentaires utiles à des tests plus couramment utilisés pour évaluer le potentiel cancérigène et sont donc répertoriées dans diverses lignes directrices et stratégies de test récentes à ces fins (35–38).

Cancérigénicité non génotoxique

Les cancérigènes non génotoxiques contribuent à un risque accru de cancer suivant une variété de mécanismes qui ne sont pas encore inclus dans les approches réglementaires internationales. Pour répondre à ce besoin, une approche intégrée des tests et de l'évaluation (IATA) des cancérigènes non génotoxiques commence à se développer au niveau international sous l'impulsion de l'OCDE (39). En parallèle le projet européen CarcinoGENOMICS FP6 a développé des tests *in vitro* basés sur la toxicogénomique et la métabolomique pour détecter les génotoxiques et cancérigènes

⁵ Le score de Klimisch est une méthode d'évaluation de la fiabilité des études toxicologiques, principalement à des fins réglementaires. Le respect des lignes directrices applicables est ce qui est pris en compte : lignes directrices de l'OCDE, pharmacopée, Bonnes Pratiques de Laboratoire (34)...

potentiels comme alternative à l'essai biologique de cancérogénicité des rongeurs de 2 ans. Les objectifs de cette initiative sont :

- De concevoir une batterie d'essais *in vitro* basés sur des mécanismes couvrant les principaux organes cibles des actions cancérogènes : le foie, les poumons et les reins.
- D'évaluer la transférabilité et la reproductibilité des modèles
- De développer des outils bio-informatiques dédiés pour servir de base aux futures validations de tests utilisant les technologies omiques.

La base de données d'EURL ECVAM sur la génotoxicité et la cancérogénicité est une base de données accessible aux chercheurs. Elle regroupe les principales données disponibles sur la génotoxicité et la cancérogénicité pour les substances médicamenteuses positives à Ames, à partir de différentes sources. (31,40,41)

En pratique, des essais d'exposition à différents composés ont permis de développer différents modèles. Ces substances peuvent être des cancérogènes génotoxiques (GTX), des cancérogènes non génotoxiques (NGTX) et des non-cancérogènes (NC). Grâce à une étude biostatistique, à la recherche bibliographique et l'analyse d'ensembles de données d'expression moléculaire, différentes voies génétiques recherchées ont été capables de prédire les mécanismes GTX ou NGTX de la carcinogenèse chimique. Enfin, l'intégration des données transcriptomiques et métabolomiques générées dans une compréhension holistique⁶ de la biologie des systèmes a permis de construire un modèle *in silico* de la carcinogenèse chimique.

Le projet carcinoGENOMICS a permis de développer :

- Le modèle rénal RPTEC/TERT1 basé sur la toxicogénomique pour prédire la génotoxicité rénale/carcinogénicité *in vivo* : il permet d'établir une distinction entre les cancérogènes génotoxiques, les cancérogènes non génotoxiques et les agents non cancérogènes avec une précision assez élevée ainsi qu'une bonne reproductibilité.
- Le modèle hépatique HepaRG basé sur la toxicogénomique génère moins de classifications erronées que les essais *in vitro* classiques (moins de faux positifs) mais sa capacité à séparer les cancérogènes non génotoxiques pour le foie des non cancérogènes est assez faible.
- Un modèle bronchique basé sur la toxicogénomique pour prédire la génotoxicité/carcinogénicité pulmonaire assez est en cours de développement et donne de premiers résultats prometteurs.

Cependant aucun de ces modèles n'a à ce jour été validé.

⁶ La vision holistique de la biologie s'oppose à la vision réductionniste. Alors que la réductionniste considère que l'activité de la cellule peut-être se décomposer en sous-fonctions, la vision holistique considère que la cellule doit être appréhendée dans son ensemble, comme un système complexe au fonctionnement en partie stochastique. Par exemple, le test MTT est inspiré d'une vision réductionniste et étudie la respiration cellulaire comme image de l'homéostasie cellulaire.

v. Pharmaco(Toxico)cinétique et Pharmaco(Toxico)dy- namie

La pharmacodynamie est l'étude des effets d'un médicament sur l'organisme. Elle est complémentaire de la pharmacocinétique qui explore les effets de l'organisme sur les médicaments.

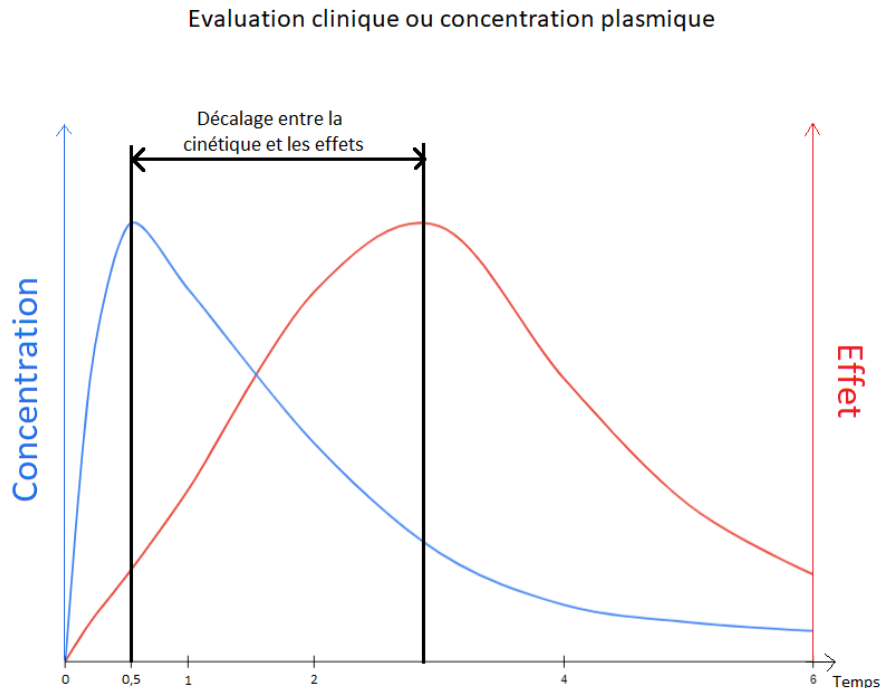


Figure 8 Visualisation schématique de la différence Pharmacocinétique/Pharmacodynamie

La pharmacocinétique, ou devenir de la molécule dans l'organisme se fait en 4 phases que l'on appelle « ADME » pour : Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination. Elle doit être étudiée *in vivo* en utilisant si possible la voie d'administration prévue chez l'Homme et doit être réalisée avant les essais cliniques de phase I.

Elle informe sur :

- Le taux d'absorption de la molécule étudiée au site d'application dans la circulation sanguine
- La vitesse et l'étendue du mouvement de la molécule du sang vers le tissu (distribution)
- Le taux et l'étendue de la biotransformation de la molécule étudiée en métabolites (métabolisme)
- Le taux d'élimination chimique de l'organisme (excrétion)

Les évaluations toxicocinétiques aident à relier la concentration/dose à l'effet toxique observé et à comprendre le mode d'action de la substance pharmaceutique et/ou de ses métabolites. (Figure 8)

La compréhension des processus toxicocinétiques qui conduisent à la formation ou à la distribution de l'espèce chimique active au(x) tissu(s) cible(s) est essentielle pour estimer la dose au(x) site(s) toxicologique(s) cible(s).

Les paramètres toxicocinétiques de base déterminée à partir d'études *in vitro* et *in silico* fourniront également des informations sur le potentiel d'accumulation de la substance médicamenteuse dans les tissus et/ou les organes et le potentiel d'inhibition ou d'induction de la biotransformation à la suite d'une exposition.

La toxicodynamique fait référence aux effets moléculaires, biochimiques et physiologiques d'une molécule ou de ses métabolites dans les systèmes biologiques.

Ces effets sont le résultat de l'interaction de la dose biologiquement efficace de la molécule active sur sa cible moléculaire. (Figure 9) Les résultats *in vitro* générés au niveau des tissus, des cellules ou des compartiments subcellulaires doivent être convertis en informations dose-réponse pour l'organisme entier.

Puisqu'il n'est pas toujours possible de mesurer la concentration tissulaire cible de la substance médicamenteuse et/ou de ses métabolites, les modèles toxicocinétiques sont de plus en plus recherchés comme outils précieux dans l'évaluation de la sécurité sanitaire.

Ces modèles *in vivo* et *in vitro* permettent de distinguer :

- Les effets propres à la molécule (pharmacodynamie spécifique) avec mise en évidence d'une relation effet-dose et effet-temps, la détermination de la DE50 (Dose Efficace 50 ou dose entraînant 50% de l'effet maximum) toujours exprimée en mg/kg et recherche du mécanisme d'action de la molécule,
- Les effets généraux
- Les éventuelles interactions

L'évaluation de la sécurité de la molécule étudiée comprend la description qualitative des propriétés toxiques ainsi qu'une quantification de l'exposition et de la réponse toxique.

Les modèles toxicocinétiques basés sur la physiologie (PBTK) sont des descriptions mathématiques des processus ADME. Ces modèles facilitent les descriptions quantitatives du changement temporel de la concentration de la substance médicamenteuse et/ou de ses métabolites dans les matrices biologiques (par exemple dans le sang, les tissus, l'urine, l'air alvéolaire).

Les modèles PBTK décrivent l'organisme comme un ensemble de compartiments caractérisés par deux catégories de paramètres :

- Les paramètres physiologiques, indépendants de la molécule active, tels que le débit cardiaque et le débit sanguin des organes (spécifiques à l'espèce, au sexe et à l'âge et largement disponibles dans la littérature publique)
- Les paramètres chimiques spécifiques qui doivent être déterminés, par exemple par des méthodes d'essai *in vitro* ou prédits par des méthodes *in silico* pour chaque substance active.

Selon la directive OCDE TG 417 (OCDE TG 417, 2008), la toxicocinétique doit être évaluée *in vivo* en utilisant le rat comme système d'essai.

Bien que les sources *in vitro* fournissent souvent une bonne image qualitative et quantitative de la formation des métabolites, des études *in vivo* complètes pour déterminer le profil et l'identification des métabolites sont souvent encore requises par les autorités réglementaires pour confirmer le devenir métabolique du composé.

Les études de profil métabolique *in vivo* sont naturellement menées chez l'animal ; cependant, les lignes directrices de la FDA (FDA 2008) stipulent que « que l'évaluation métabolique *in vivo* chez l'homme soit effectuée le plus tôt possible ».

Le premier objectif est de comparer les profils de métabolites entre l'homme et l'animal utilisés dans les études de toxicité, et d'identifier en outre les métabolites disproportionnés chez l'homme, c'est-à-dire présents chez l'homme uniquement ou présents à des niveaux plus élevés chez l'homme par rapport aux animaux.

Il devient de plus en plus clair que les données toxicocinétiques d'origine animale ne sont pas toujours fiables pour une extrapolation à l'Homme, en raison des différences inter-espèces dans les voies physiologiques, biochimiques et métaboliques.

Pour ces raisons, et en raison des exigences de la directive européenne 2010/63 / UE sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, du règlement cosmétique de l'UE (CE 1223/2009) et du règlement REACH (CE 1907/2006), il existe une pression croissante pour développer des méthodes toxicocinétiques alternatives (non animales) pour déterminer de manière fiable les paramètres ADME. Ces tests sont primordiaux dans le secteur cosmétique, où l'expérimentation animale est totalement interdite.(42)

L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a décrit dans une directive de 2012 que les données toxicocinétiques peuvent dériver d'une série d'études *in vitro*, *in silico* et *in vivo*, et la cinétique à dose unique et répétée.

Une procédure ADME *in vitro* a atteint le niveau d'une ligne directrice de test de l'OCDE (c'est-à-dire qu'elle a été validée) : l'absorption cutanée *in vitro* (OCDE TG 428, 2004) (Annexe 6).

D'autres méthodes *in vitro* et *in silico* pour mesurer les processus ADME sont disponibles et sont couramment utilisées pour des intérêts internes spécifiques ou utilisées comme données toxicocinétiques à l'appui pour les dossiers réglementaires basés sur des données d'essais *in vivo*.

Dans le but d'établir une norme pour le métabolisme et la toxicité hépatiques dans les études de validation, l'ECVAM coordonne des études sur l'induction du cytochrome CYP P450 pour créer un modèle standard fiable décrivant le métabolisme humain. Pour cela, des lignées cellulaires humaines cryoconservées HepaRG et des hépatocytes humains cryoconservés sont utilisés. L'induction des iso-enzymes CYP a été identifiée comme un événement clé dans un certain nombre d'événements indésirables. Le critère « induction des CYP » est mesuré après une exposition à différents produits : les composés à tester, deux composés de référence (β -naphthoflavone et

rifampicine) et un cocktail de substrats prototypiques (43) pour différentes isoformes de CYP. Ce test n'a cependant pas encore été validé par l'EURL-ECVAM.

vi. Reprotoxicité et toxicité du développement

Ces études ont pour objectif d'évaluer l'impact du futur médicament sur la fertilité et sur la gestation.

Les études de fertilité et du développement embryonnaire précoce (jusqu'à l'implantation) sont réalisées sur une espèce de rongeur, en général le rat. La substance médicamenteuse est alors administrée plusieurs semaines avant l'accouplement, à trois niveaux de doses. Le test doit se dérouler avec le contrôle d'un groupe témoin d'animaux non traités.

Les études du développement embryo-fœtal et les études de tératogénèse sont menées sur deux espèces, un rongeur (en général le rat) et un non-rongeur (par exemple le lapin). Cette étude est réalisée chez des femelles en gestation depuis l'accouplement jusqu'à la fin de l'organogénèse, avec trois niveaux de doses.

Enfin les études du développement pré et post-natal sont réalisées sur une espèce de rongeur de la fin de l'organogénèse jusqu'au sevrage des petits, à trois niveaux de doses. Cette étude évalue l'impact du candidat-médicament sur la parturition, le comportement maternel, l'allaitement et développement des petits. L'étude peut parfois se poursuivre tout au long de la vie des petits et de leurs descendances.

vii. Effet sur la descendance

Les effets sur la descendance sont étudiés par administration à la mère de la substance à étudier au cours de la gestation. L'étape de formation de l'embryon (c'est-à-dire lors des quatre premières semaines) est en effet particulièrement à risques. On différencie ainsi les effets embryotoxiques (effets survenus lors des deux premiers mois de la grossesse) ou de foetotoxiques (à partir du troisième mois).

Une substance est dite tératogène lorsque la substance administrée aboutit à des malformations visibles chez la descendance. L'exemple le plus célèbre est celui du thalidomide utilisé comme anti-nauséeux chez la femme enceinte et qui a provoqué entre 1950 et 1960 de 10 000 à 20 000 phocomélies. Par extension, on parle d'effet tératogène pour toute anomalie morphologique, fonctionnelle ou de développement dû à la prise d'un médicament par la mère lors de la grossesse.

Pour tester l'effet tératogène, les essais sont réalisés sur des femelles en gestation de deux ou trois espèces animales différentes. La substance est administrée à différentes doses de manière répétée en général durant toute la durée de la gestation. A leur naissance, les petits sont examinés pour s'assurer de leur bonne santé post-natale et l'essai peut dans certains cas être prolongés jusqu'à la génération suivante.

On contre-indiquera le médicament chez la femme enceinte dès que des effets imprévus et délétères importants ou fréquents sont observés. Lorsque les anomalies ne sont

pas plus fréquentes que celles qui surviennent spontanément, le risque tératogène est qualifié de faible.

Ces essais ne garantissent cependant pas l'innocuité du médicament pour la femme enceinte.

L'initiative ChemScreen a été développée dans le but d'améliorer ces prédictions en alliant essais *in vitro/in silico*. Elle a été validée par l'EURL ECVAM. (Figure 12)

Dans un premier temps, des méthodes *in silico* sont utilisées pour le dépistage des effets toxiques pertinents d'une ou plusieurs substance active. Les substances prometteuses subissent ensuite une série de tests *in silico* et *in vitro* combinant la connaissance des effets toxiques liés à la reproduction avec la connaissance des mécanismes de ces effets. ChemScreen se concentre sur des outils de dépistage moléculaire des substances reprotoxiques

3. L'expérimentation animale

a. Historique

L'expérimentation animale consiste à analyser le fonctionnement des systèmes biologiques de l'Homme à partir d'observations sur un matériel vivant (appelé modèle animal). Un être vivant est un ensemble de tissus dans lequel des réactions et interactions complexes ont lieu à chaque instant. Dès lors, utiliser un autre être vivant comme modèle offre des avantages évidents pour les phases précliniques (44–46). La pratique est très ancienne : bien que taboue dans la Grèce antique, des médecins comme Hérophile et Erasistrate la pratiquait.(47) Cependant les bases de la démarche expérimentale moderne sur l'animal ont été développées par Claude Bernard dans son livre « *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* ».

« *Je n'admets pas qu'il soit moral d'essayer sur les malades dans les hôpitaux des remèdes plus ou moins dangereux ou actifs, sans qu'on les ait préalablement expérimentés sur des animaux. [...] Ce que l'on obtient chez les animaux peut être concluant pour l'homme quand on sait bien expérimenter* » (48)

A la même période au Royaume-Uni, Darwin bien que défenseur des droits animaux, défend lui aussi la nécessité de ces procédures : « *Je crains que dans quelques parties de l'Europe on n'accorde que peu d'attention aux souffrances des animaux, et si cela était vrai, je serais heureux d'apprendre qu'on prend des mesures législatives contre l'inhumanité dans ces pays. D'un autre côté, je sais que la physiologie ne peut accomplir de progrès si ce n'est par des expériences sur des animaux vivants, et j'ai la conviction profonde que quiconque retarde les progrès de la physiologie commet un crime contre l'humanité.* » (1875) (49)

Cette pratique a sans nul doute fait ses preuves comme l'attestent certaines des plus grandes découvertes de la médecine. En effet à l'exception d'un, tous les prix Nobel de physiologie et de médecine ont été rendus possibles grâce à l'expérimentation animale (Annexe 3).

L'expérimentation animale a ainsi participé à quasiment doubler l'espérance de vie en un siècle (45 ans en 1900, 80 ans en 2015) et ce, grâce aux avancées prodigieuses des connaissances en biologie et à la mise au point de nombreux médicaments à partir de recherches chez l'animal.

Une célèbre phrase résume la position des institutions académiques et les scientifiques individuels : *"Virtually every medical achievement of the last century has depended directly or indirectly on research with animals."* Cette phrase a été reprise par d'éminents organismes, y compris le Service de santé publique des États-Unis, la *Royal Society* et le ministère de la Santé du Royaume-Uni. (50–52) En 2005, plus de 500 éminents universitaires ont signé une pétition publique à l'appui de cette déclaration, dont trois lauréats du prix Nobel et plus de 250 professeurs.

Il est rare qu'une déclaration aussi tranchée bénéficie d'un tel soutien sans réserve de la part de la communauté scientifique. Il ne serait pas déraisonnable de supposer que c'est parce que c'est manifestement vrai. Il est également indéniable que tous les médicaments à succès mis au point ces dernières années ont impliqué l'utilisation de modèles animaux, ces tests étant obligatoires à la suite de la catastrophe de la thalidomide.

Il s'agit d'une technologie relativement simple et peu coûteuse à mettre en place et à utiliser.

De plus il existe des modèles animaux pour une grande majorité des maladies humaines : les animaux souffrent de nombreuses maladies semblables à l'Homme que ce soient des cancers, la tuberculose, la grippe ou encore l'asthme. 60% des agents infectieux pathogènes pour l'Homme le sont d'ailleurs aussi pour une ou plusieurs espèces animales.

On retrouve d'ailleurs de nombreux médicaments identiques chez l'Homme et en médicaments vétérinaires, c'est le cas par exemple d'antibiotiques, d'analgésiques ou de tranquillisants.

Des approches substitutives réductrices, trop simplistes, ne permettent pas d'appréhender la complexité du vivant. Il convient dès lors de choisir un modèle animal suffisamment fidèle et discriminant pour extrapoler les résultats à l'Homme sans risque⁷..

Pourtant les réglementations demandent aux scientifiques d'avoir recours aux essais sur animaux vivants que lorsqu'ils ne peuvent faire autrement. Dans les travaux de recherche qui le permettent, ils font appel aux méthodes alternatives avant d'utiliser un modèle animal. Ils analysent les mécanismes moléculaires précis grâce à la biologie moléculaire, la biologie cellulaire et l'expression des gènes notamment par la

⁷ Russel et Burch souligne que deux facteurs jouent un rôle dans l'adéquation entre le modèle et ce qu'il doit modéliser : la fidélité (c'est à dire la qualité du modèle à être généralement similaire à ce qu'il doit modéliser) et la discrimination (c'est à dire la capacité à être spécifique de ce qui est modélisé. Les auteurs argumentent qu'il est plus intéressant d'avoir un modèle très discriminant/peu fidèle qu'un modèle très fidèle/peu discriminant.

culture cellulaire. Mais l'étape des essais animaux leur permet de valider les hypothèses dans un contexte intégré plus proche de la situation naturelle d'un organisme entier.

En France, 1.865.403 animaux ont été utilisés comme modèles animaux en 2019 (Annexe 4). Sur ce total, 29% visent à satisfaire des obligations législatives ou réglementaires. Ce sont des obligations d'origine européenne dans 97% des cas (53). La grande majorité de ces utilisations (73%) sont liées à la validation de médicaments à usage humain ou vétérinaire, en incluant les vaccins.

L'espèce animale choisie comme modèle doit permettre de mimer un processus physiologique ou physiopathologique, spontané ou induit, équivalent aux phénomènes observés chez l'homme. Il permet donc d'appréhender des systèmes complexes tels que le fonctionnement d'organes ou de systèmes entiers. Ce choix est crucial, comme l'a montré l'exemple de la thalidomide, exempt d'effet en phase pré-clinique sur différents modèles animaux, mais responsable de conséquences importantes chez l'homme. Le critère du choix de l'espèce animal en début de phase pré-clinique est déterminant pour l'investigation :

L'étape préliminaire consiste à déterminer les similarités et les différences qui existent entre l'espèce modèle et l'Homme. On distingue alors trois modèles :

- Le modèle *isomorphique* : les symptômes obtenus sur l'espèce modèle sont les mêmes que ceux observés chez l'Homme.
- Le modèle *homologue* : les mécanismes mis en jeu entre l'espèce modèle et l'Homme sont similaires.
- Le modèle *prédictif* : la réponse obtenue au traitement est comparable.

Le choix de l'animal peut se porter aussi selon des considérations pratiques : son cycle de vie et son cycle de reproduction nécessitent d'être de durées compatibles avec le temps de l'expérimentation, l'espèce doit être facile à élever et de taille adaptée (permettre une standardisation de l'environnement sans altérer le bien-être et la reproduction de l'animal). Tout ceci a pour objectif d'améliorer la reproductibilité des essais.

Enfin le fond génétique et l'influence multigénique des phénotypes sont aussi à prendre en compte : la mutation d'un gène n'entraîne pas les mêmes effets selon le fond génétique⁸ sur lequel elle s'exprime. Il est également important de ne pas se focaliser sur les traits phénotypiques attendus : la mutation de gènes orthologues n'aboutit pas toujours aux mêmes phénotypes selon les espèces.

De nombreux organismes peuvent être modèles. Les invertébrés peuvent être utilisés pour des analyses mécanistiques et les vertébrés inférieurs et supérieurs permettent une étude plus intégrée. Chaque modèle a ses avantages et inconvénients propres :

⁸ Fond génétique : Multiples facteurs, généralement subtiles dans le génome, qui diffèrent entre chaque individu et peuvent affecter la fonction des gènes. Le fond génétique biaise la capacité à interpréter les informations stockées dans un génome individuel. Par exemple, deux personnes portant la même mutation causant une fibrose kystique (maladie pulmonaire héréditaire) peuvent développer une forme légère ou une forme grave de maladie, en raison des différences entre leurs origines génétiques.

- La souris possède d'importantes similitudes génétiques (98% des gènes sont communs à l'Homme) mais aussi immunologiques, physiologiques et pathologiques. C'est le modèle le plus utilisé.
- Le poisson zèbre a pour avantage d'avoir une reproduction et une croissance rapide, des embryons transparents et qui se développent en dehors de la femelle. Environ 85% de ses gènes sont communs avec l'Homme.
- La drosophile (ou mouche du vinaigre) a elle aussi une reproduction et une croissance rapide. Son génome a entièrement été séquencé et 36% de ses gènes sont communs avec l'Homme.
- Le chien possède des similitudes génétiques, immunologiques, physiologiques avec l'Homme et développe des pathologies communes.
- Enfin le singe a une grande proximité génétique anatomique et physiologique avec l'Homme. 99% des gènes sont communs. Cependant il s'agit d'un modèle très peu utilisé. L'expérimentation est réalisée essentiellement sur des macaques et l'utilisation de chimpanzés, bonobos, gorilles et orang-outang est interdite.

Si les essais animaux sont soumis à la même organisation que toute expérimentation sur des végétaux ou sur un matériel inerte, une distinction doit être faite par le fait que le sujet expérimental est pourvu d'un système nerveux et qu'il peut donc être doué de sensibilité. Cette sensibilité des animaux peut s'exercer à l'égard des conditions dans lesquelles ils sont placés lors d'une expérimentation, ce qui amène à discuter de contraintes imposées à l'animal.

b. Réglementation européenne relative à l'expérimentation animale

La nécessité de l'expérimentation animale pour mettre un médicament sur le marché est relativement récente.

Aux Etats-Unis par exemple, elle a fait suite d'un scandale en 1937 : l'élixir sulfanilamide était un antibiotique sulfamide mal préparé qui a provoqué un empoisonnement de masse et a causé la mort de plus de 100 personnes. L'expérimentation animale n'était pas requise par la loi, et l'entreprise Massengill n'en a effectué aucun ; il n'y avait aucun règlement à l'époque exigeant des tests d'innocuité des médicaments avant la commercialisation. L'indignation générale qui a suivie a conduit à l'adoption de la loi fédérale sur les aliments, les médicaments et les cosmétiques de 1938 donnant à la FDA un plus grand pouvoir de régulation.(54,55)

La réglementation encadrant l'expérimentation animale varie selon le pays mais en Europe, les essais sur les animaux sont rigoureusement encadrés.

La première législation sur la protection des animaux de laboratoire est la Convention STE 123(56) élaborée en 1985 par le Conseil de l'Europe. Elle aborde notamment la réduction du nombre d'expériences et d'animaux utilisés à des fins scientifiques mais précise également les conduites à tenir en termes d'hébergement, de soins et de réalisation des essais. Elle aborde de plus dans son article 6 le développement des méthodes alternatives :

“Il n'est pas effectué de procédure pour l'un des buts indiqués à l'article s'il peut être recouru raisonnablement et pratiquement à une autre méthode scientifiquement acceptable n'impliquant pas l'utilisation d'un animal.

Chaque Partie devrait encourager les recherches scientifiques tendant à développer des méthodes qui pourraient donner la même information que celle obtenue dans les procédures”.

La première directive européenne sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques de 1986 est la directive 86/609 (57). Elle est une retranscription de cette convention. Elle a été révisée en 2010 (directive 2010/63) et a été réexaminée(58). Cette directive européenne a elle-même été transposée en droit français en 2013 (décret 2013-118 associé à 5 arrêtés d'application)(59).

Les grands principes de la réglementation sont :

i. La validation de chaque projet par un comité d'éthique

Les recherches sur l'animal ne sont licites que si elles « *revêtent un caractère de stricte nécessité* » et les chercheurs doivent être « *résolus à limiter l'utilisation des animaux à des fins expérimentales (...) avec pour finalité de remplacer cette utilisation partout où cela est possible* ».

Une autorisation est nécessaire pour démarrer tout projet de recherche utilisant des animaux. Après avoir été étudiée par un comité d'éthique, l'autorisation est délivrée par le ministère de la Recherche. L'autorisation est délivrée pour une durée de 5 ans maximum à condition bien sûr que le projet ait reçu une évaluation favorable du comité d'éthique de l'établissement dans lequel il sera réalisé.

ii. Un personnel formé à manipuler les animaux

Tous les personnels qui manipulent des animaux doivent posséder une qualification appropriée, et assurer le maintien et l'actualisation de leurs compétences. Un temps de formation continue d'au minimum 3 jours tous les 6 ans est désormais exigible. Les personnels qui travaillent avec des animaux d'espèces non domestiques doivent de plus détenir un certificat de capacité pour l'entretien et l'élevage des espèces en question.

iii. Un lieu de vie et d'exploration adapté respectant le bien-être animal

Le lieu de vie des animaux est lui aussi très réglementé. Son ouverture nécessite un agrément délivré à la suite d'inspections vétérinaires de la *Direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations* et officialisé par un arrêté préfectoral, après visites des inspecteurs vétérinaires.

Cet agrément n'est valable que 6 ans et doit être renouvelé par écrit auprès du ministère de l'Agriculture. La demande doit justifier du respect de normes fixées par l'arrêté ministériel *Arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement*

et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles.

Cet arrêté s'applique donc aussi aux établissements éleveurs ou fournisseurs d'animaux dans le but d'assurer le bien-être des animaux tout au long du processus.

Enfin un autre agrément dépendant du ministre de la Recherche est obligatoire en cas d'utilisation d'animaux génétiquement modifiés.

Chaque laboratoire, académique ou industriel, est aidé dans cette démarche par les *structures Bien-être animal* (SBEA) et suit la Charte nationale d'éthique rédigée par la *Commission nationale d'expérimentation animale et le Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale*. Comme préconisé dans le rapport de l'OPECST (Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques) de 2009, les laboratoires peuvent également faire le choix d'être accrédités par un organisme indépendant, ce qui implique un audit régulier.

iv. La mise en place au mieux des “3R”

Théorisés par William Russell et Rex Burch en 1959 dans leur ouvrage “*The principles of humane experimental technique*” (60), les 3R sont au cœur de la Directive 2010/63/EU et de la méthodologie actuelle des essais précliniques.

Les 3R sont les initiales de “*Replacement*”, “*Reduction*” et “*Refinement*”

Le raffinement (*Refinement*)

Russell et Burch ont examiné un large éventail de questions, y compris l'anesthésie, l'analgésie, la technique d'euthanasie, les sites d'injection, l'utilisation d'espèces moins sensibles et l'adoption de procédures expérimentales moins intenses pour induire le stress. La portée du raffinement s'est finalement étendue au-delà de la limitation des effets négatifs et est arrivée à inclure l'amélioration du bien-être animal, par exemple en hébergeant des animaux sociaux en groupes plutôt qu'individuellement, ou en enrichissant leur environnement de cage avec des objets tels que du matériel de nidification.

De nos jours, un autre facteur important entre en ligne de compte : l'utilisation des procédures non invasives comme l'imagerie et la télémétrie, etc.

Dans le raffinement, il convient d'évaluer précisément la balance entre coût pour les animaux et bénéfice des résultats attendus de l'expérimentation.(61)

La réduction (*Reduction*)

La réduction signifie diminuer le nombre d'animaux utilisés en repensant la conception et les analyses d'expériences.

Dans ce contexte, Russell et Burch ont discuté d'une variété d'approches, telles que :

- Le calcul de la taille minimale de groupe nécessaire pour mener spécifiquement à bien une procédure : cela nécessite de tenir compte de la variabilité des critères que l'on mesure, la précision des mesures et de définir la différence qui sera statistiquement significative entre animaux témoins et animaux testés

- La réalisation de tests séquentiels plutôt que simultanés pour exploiter les informations apprises lors des étapes précédentes,
- L'utilisation de conceptions expérimentales avancées qui a augmenté la puissance statistique tout en utilisant moins d'animaux.
- Enfin une utilisation préférentielle d'animaux génétiquement uniformes, ou des descendants de croisements entre deux lignées différentes, comme moyen de contrôler les variations interindividuelles.

De nos jours, une autre approche est possible : le stockage des organes ou tissus dans une banque de tissus ou de fluides. Ce type de banque est en effet un facteur de réduction future dans la mesure où elle permet d'éviter de mettre à mort des animaux aux fins de récupération d'organes ou de tissus.(61)

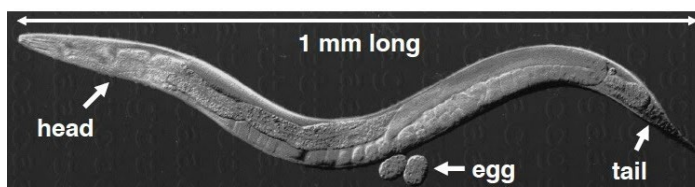
Dans de nombreux cas, mais pas tous, des modèles statistiques et des approches de conception expérimentale peuvent être incorporés pour réduire le nombre d'animaux (62). Dans certains cas, l'optimisation de la conception signifie qu'il faudrait plus d'animaux pour atteindre les objectifs scientifiques souhaités. Le souci de se concentrer sur la réduction en soi a été discuté dans un éditorial de *Nature Genetics*. Cet éditorial a montré notamment que l'échec des traitements de la sclérose latérale amyotrophique murine à se traduire en clinique était dû à un petit nombre de groupes et à des expériences insuffisantes (63).

Le remplacement (*Replacement*)

Enfin, le remplacement fait référence aux moyens d'éviter d'utiliser des animaux entiers et sensibles, en pratique :

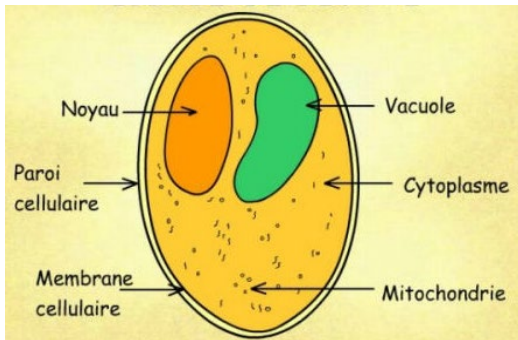
- L'utilisation d'approches non animales (méthodes alternatives) telles que des méthodes *in vitro*, des microorganismes et de la simulation informatique,
- L'utilisation préférentielle d'invertébrés ou à défaut d'embryons de vertébrés à un stade précoce,

Dans ce cas-là, on parle de remplacement relatif : on utilise alors préférentiellement un animal dont la sensibilité (c'est-à-dire le potentiel de perception de la douleur) est moins importante. Par exemple (Figure 9) :



Des nématodes comme *Caenorhabditis elegans*

Des levures comme *Saccharomyces cerevisiae*



Des arthropodes comme *Drosophila melanogaster*



Des embryons de vertébrés comme les embryons de poisson-zèbre *Danio rerio*

Figure 9 Exemple de modèles utilisés en Remplacement Relatif

- L'utilisation de vertébrés anesthésiés.

Au fil du temps, l'utilisation de vertébrés anesthésiés a fini par être considérée comme un raffinement plutôt qu'un remplacement.

Il existe de nombreux cas où les progrès des 3R ont permis d'améliorer la science des modèles animaux précliniques (64–66). Malgré le lien entre les 3R et le progrès scientifique, de nombreux scientifiques nord-américains associent plus facilement les 3R aux problèmes de bien-être animal qu'à la science. Une étude canadienne a montré que de nombreux scientifiques ne croyaient pas que le remplacement était possible pour le moment un certain nombre de chercheurs étaient fermement convaincus que l'accent devrait être mis sur des données animales de qualité plutôt que sur la réduction du nombre d'animaux (67).

c. Limites

i. Prédicativité

Les animaux, notamment les rongeurs, actuellement les plus utilisés, ne sont pas des modèles parfaits de la physiologie humaine, car, comme l'a résumé M. Ménache : « Nous ne sommes pas des rats de 70 kg ». L'échec de neuf médicaments potentiels sur dix (validés sur des modèles animaux au préalable) lors des phases cliniques, pendant lesquelles ils sont testés chez l'homme, illustre bien les limites des modèles animaux.

Une étude de Robert AJ Matthews a étudié le poids de la preuve des essais animaux.(68) Tous les modèles animaux possèdent à la fois des valeurs de sensibilité et de spécificité, et conduisent ainsi à des valeurs de poids de preuve spécifique. Cependant, comme l'ont souligné les auteurs, il existe une pénurie frappante de données comparatives quantitatives pour les modèles animaux.(68–71) Diverses explications peuvent être proposées à ce sujet.

Premièrement, les composés qui produisent des effets inacceptables dans les modèles animaux ne passeront pas aux essais sur l'homme, il est donc difficile d'obtenir des taux de sensibilité/de faux positifs représentatifs pour les modèles animaux problématiques.

Deuxièmement, il est souvent difficile d'établir des critères suffisamment clairs pour permettre la catégorisation en tant que vrais positifs ou vrais négatifs.

Troisièmement, une grande partie des données comparatives animal-humain est obtenue dans des conditions de confidentialité commerciale.

Pourtant une fois ces complications dépassées, l'auteur conclue que les données ne prouvent pas de manière statistiquement significative que le modèle animal ait une portée prédictive. Cela ne veut pas dire que les modèles animaux n'apportent pas de poids probant, encore moins qu'ils n'ont aucun rôle dans la recherche. Il existe de nombreux exemples de recherche sur les animaux fournissant des informations qui ont transformé la science médicale. Mais il n'est pas possible de prouver la prédictivité de ces modèles, seul ou en combinaison.

ii. Réglementation

Il a été noté à plusieurs reprises par les représentants de l'industrie pharmaceutique que la réglementation diffère d'une région du monde à une autre ; ainsi, la législation est moins contraignante en Amérique du Nord ou surtout en Asie, par rapport à l'Europe, même si la situation en Asie s'améliore rapidement. Pour l'OPECST(72), durcir excessivement la réglementation risquerait de peser sur la compétitivité des laboratoires académiques et industriels, et d'encourager la délocalisation des études sur animaux par les entreprises vers des lieux où les exigences sont moins respectueuses des animaux. La réglementation est donc dépendante de divers facteurs non scientifiques.

Plus de dix ans après la mise en place de la directive 2010/63/UE relative à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques, les résultats obtenus sont très éloignés de ceux escomptés. Bien que le rapport quinquennal de la Commission européenne évoque une « évolution positive », l'analyse réalisée par le Comité Transcience⁹ met en relief certaines lacunes du texte et questionne sur sa mise en œuvre.

Autorités compétentes : Quinze Etats membres ont une autorité compétente publique chargée de gérer les établissements et treize autres Etats ont plus d'une autorité compétente. La France se trouve dans ce second groupe avec, en 2017, 125 autorités compétentes non publiques et locales (nommées « comités d'éthique locaux »). Ces comités sont habilités à évaluer les projets et à réaliser l'évaluation rétrospective. En Europe, c'est le nombre le plus important d'autorités compétentes, loin devant l'Espagne (en second) avec 89 autorités compétentes qui sont, eux, des comités nationaux et publics. Les seuls Etats membres de l'Union européenne à avoir délégué l'appréciation rétrospective de projets à des instances non-publiques sont la France, la Belgique et –pour partie– l'Espagne. De plus ces comités d'éthiques sont composés à 60% de membres en lien avec l'expérimentation animale. Or selon la Commission Européenne, plus les autorités compétentes sont nombreuses - comme c'est le cas en France - plus il est difficile de garantir une évaluation efficace et cohérente des projets.

Autorisations : Le nombre de demandes d'autorisations refusées est relativement faible : il est de 3% en moyenne au niveau européen. La France est au second rang pour le nombre de projets autorisés (3708 projets acceptés pour 0 projets refusés) juste derrière l'Allemagne (3800/0). La délivrance des autorisations par le ministère de la Recherche se fonde exclusivement sur l'évaluation des comités d'éthique. La justification étant qu'elles sont généralement révisées et améliorées pendant le processus.

Les inspections : Le rythme des inspections et l'effectivité des sanctions diffèrent sensiblement d'un Etat à l'autre. En 2017, si 40% des 3 412 inspections menées dans les Etats membres auprès des établissements, étaient « inopinées », 17% seulement l'étaient en France, soit le taux le plus bas d'Europe (bien loin des 60% du Royaume-Uni). Pourtant, « *plus les inspections sans avertissement préalable des établissements seront nombreuses, plus les infractions à la réglementation pourront être efficacement relevées. La France est, une fois de plus, dans le groupe des mauvais élèves* » explique Mme Obriet.

Appréciations rétrospectives : Au nom de la cohérence du droit de l'Union Européenne, si les animaux ont -comme il est affirmé dans la Directive -une « valeur intrinsèque » et que par conséquent la vie de chacun d'entre eux doit être respectée, il convient que tout projet utilisant des animaux donne lieu à une appréciation rétrospective. Toutes ces évaluations a posteriori auront vocation à être publiées sur le site des ministères de la recherche des Etats membres, par souci de transparence vis-à-vis des citoyens. En France, le ministère de la Recherche a fait le choix de ne pas les

⁹ TRANSCIENCE est un groupe de réflexion multidisciplinaire (association loi de 1901) qui œuvre pour le développement d'une recherche sans utilisation d'animaux et pour une protection accrue de ceux qui sont encore utilisés à des fins scientifiques

publier. Aucune information n'est donc disponible concernant les appréciations rétrospectives, qu'elles entrent ou non dans le cadre des obligations réglementaires.

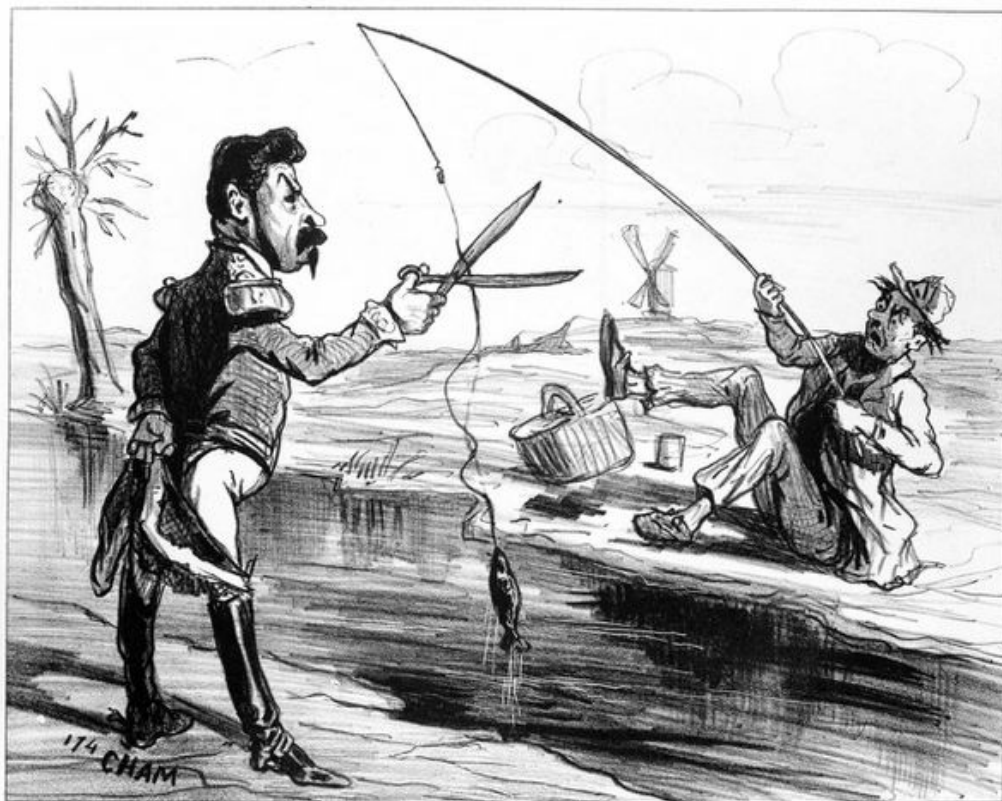
4. Cadre des alternatives à l'expérimentation animale

a. Historique

La considération de l'animal et la reconnaissance de sa souffrance a connu une évolution progressive, là aussi différente selon les pays.

En Europe comme dans le monde, le Royaume-Unis a été le fer de lance du droit animal, notamment dans la recherche. L'éthique utilitariste de Jeremy Bentham (73) et la vision de Charles Darwin s'inscrivent dans un changement des mentalités qui a permis les premières lois de protection des animaux, adoptées au XIX^e siècle. Plus précisément le Royaume-Unis est précurseur par son *Martin's Act* de 1822 qui a interdit les actes de cruauté envers le bétail (74).

En France c'est surtout Victor Hugo qui à l'époque s'est fait entendre contre la vivisection. Bien que son combat n'ait pas permis d'avancées sur le domaine, sous son impulsion et celle du général Grammont, la première loi de protection des animaux en France est passée (*loi Grammont de 1850 relative à la protection des animaux de compagnie*). Cependant ce type d'intérêt passe pour de la sensiblerie excessive dans la France du XIX^e siècle (Figure 10). En 1882, la veuve et les filles de Claude Bernard lancèrent la Ligue populaire contre la vivisection dont Victor Hugo accepta la présidence en 1883 ; il déclara dans son discours inaugural : « *La vivisection est un crime !* »



Chez Aubert & Co. Pl. de la Bourse, 35, Paris.

Lith. de M^r V. Aubert, r. de l'Écluse, 5, Paris.

Le Général Grammont continuant, même pendant les vacances, de remplir la haute mission philanthropique qu'il s'est imposée. Ce qui le rend le cauchemar de tous les pêcheurs de son département.

Figure 10 Caricature du journal *La Caricature* M.e. V.e. Aubert (chez Aubert et Cie), 1850

L'agitation antivivisectionniste est devenue particulièrement forte au cours des années 1870. *The Principles of Humane Experimental Technique* de Russell et Burch ont été publiés pour la première fois en 1959 (60). L'ouvrage propose une nouvelle science appliquée qui améliorerait le traitement des animaux de laboratoire tout en faisant progresser la qualité de la science dans les études utilisant des animaux. Avec les concepts des « 3R » ils ont développés ce qui sera par la suite connu sous le nom d'« alternatives »¹⁰. Leur objectif est de minimiser le potentiel de douleur et de détresse des animaux dans la recherche biomédicale autour de la notion d'« humanité », par opposition à l'« inhumanité » (représentant pour les auteurs ce qu'ils nomment la détresse animale). (76)

Magendie, dont Claude Bernard fut le plus célèbre élève, devint un contre-symbole de la lutte antivivisection jusqu'en Grande-Bretagne pour ses expériences sur les animaux sans anesthésie. Ses pratiques ont même été mentionnées à la Chambre des communes par Richard Martin lorsqu'il a présenté un projet de loi pour l'abolition de l'appâtage des ours et qui allait devenir le « *Cruel Treatment of Cattle Act* » de 1822,

¹⁰ La notion d'alternative est absente des ouvrages de Russel et Burch. Elle ne sera développée pour la première fois que par David Henry Smyth en 1978 dans « *Alternatives to Animal Experiments* » (75) Le terme a été repris et popularisé par la suite grâce au Frame (*UK Fund for the Replacement of Animal in Experiment*)

l'une des premières lois sur la protection des animaux. Il sera à nouveau évoqué dans le rapport en faveur de la réglementation de l'expérimentation animale qui a conduit au *Cruelty to Animal Act* (« Loi sur la cruauté envers les animaux ») de 1876, le premier texte législatif à réglementer l'expérimentation animale dans le monde. À cette époque, Magendie était mort depuis plus de vingt ans (77,78). Ce texte impose aux expérimentateurs de poursuivre un but utile, de n'opérer que sous anesthésie, de tuer rapidement l'animal ou encore de renoncer aux vivisections pédagogiques.

Ce projet de loi durera 110 ans, jusqu'à la promulgation de la loi de 1986 *Animal (Scientific Procedures) Act*, et restera la seule législation connue à réglementer les expérimentations animales pendant près de 50 ans.(79)

Aux Etats-Unis, le *John Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing* (CAAT) créé en 1981 contribue aussi fortement à la diffusion des alternatives aux essais animaux. L'institut a été fondé à une époque où la communauté scientifique en général et les toxicologues en particulier étaient fortement critiqués pour ce qui était perçu comme une utilisation excessive d'animaux pour les tests de sécurité de routine. Les critiques du public ont été renforcées par les réserves exprimées par certains toxicologues selon lesquelles les pratiques actuelles ne suivaient pas le rythme des progrès scientifiques. Son objectif est la promotion de solutions alternatives basées sur les 3R afin d'évaluer l'innocuité et l'efficacité des substances thérapeutiques. Depuis 1981, les statistiques publiées par l'industrie révèlent que certaines entreprises ont réduit les tests *in vivo* jusqu'à 90 % pour certains paramètres. Un certain nombre d'entreprises ont même complètement éliminé l'expérimentation animale. (80)

Une conséquence du remplacement en 2010 de la directive 86/609/CEE par la directive 2010/63/UE a été la formalisation et l'élargissement du rôle de l'*European Centre for the validation of Alternatives Methods* (ECVAM). Les missions de l'EURL ECVAM (article 48/annexe VII de la directive 2010/63) englobent désormais :

- La coordination et la promotion du développement, de la validation et de l'utilisation de méthodes alternatives ;
- La centralisation des informations ;
- La mise en place, le maintien et la gestion des bases de données publiques et des systèmes d'informations sur les méthodes alternatives ;
- La promotion du dialogue entre les législateurs, les régulateurs et toutes les parties prenantes concernées en vue du développement, de la validation, de l'acceptation réglementaire, de la reconnaissance internationale et de l'application d'approches alternatives.

Des progrès scientifiques et techniques considérables sont réalisés dans le développement de méthodes non animales par le biais d'une série de projets financés par l'UE et de partenariats collaboratifs. EURL ECVAM joue un rôle de soutien dans de telles activités en apportant son expertise, en fournissant des conseils sur la caractérisation et la normalisation des méthodes, et en partageant les résultats des activités de recherche interne pertinentes. L'objectif global est d'identifier des méthodes prometteuses et de faciliter leur implémentation pour évaluer la sécurité des substances médicamenteuses.

Deux évolutions sont à noter :

- Une réglementaire avec la prise en compte d'alternatives dans des référentiels réglementaires (nouvelles monographies de la *Pharmacopée européenne* reconnue par l'EDQM) et la validation réglementaire de ces méthodes (EURL Ecvam, OMS, OCDE). On retrouve la même impulsion dans le domaine de l'évaluation des risques des produits chimiques (réglementation REACH, avec par exemple la reconnaissance des *read-across* et les *guidelines* ECHA)

Au niveau européen, l'EDQM (Direction européenne de la qualité du médicament et soins de santé) est à l'initiative d'une standardisation de ces nouvelles méthodes appliquées au contrôle qualité des médicaments biologiques afin de les intégrer dans la *Pharmacopée européenne* sous forme de monographies.

En 2017, l'Agence Européenne du Médicament (EMA) a décrit la méthode de transfert des méthodes d'un laboratoire à un autre dans des lignes directrices et vérifié son utilisation à des fins réglementaires conformément aux règles 3R.

- Une augmentation des actions incitatives favorisant le développement de méthodes la promotion des 3R.

Ces actions peuvent être ponctuelles et locales (travaux des structures de bien-être animal SBEA, création de prix locaux pour la mise au point de nouvelles méthodes de raffinement), nationales (création prix nationaux pour la mise au point de nouvelles méthodes de remplacement tels que le prix Alfred Kastler décerné par la Fondation du Droit Animal), voire internationales, sous forme d'appels à projets dédiés.

b. Réglementations des méthodes alternatives dans le développement et l'autorisation des substances pharmaceutiques

Les politiques et la législation de l'UE appellent à trouver des moyens innovants et plus efficaces d'essais de sécurité et d'évaluation des risques chimiques qui ne dépendent pas des tests sur les animaux. Des technologies de pointe telles que des modèles informatiques, des méthodes *in vitro* et des dispositifs d'organe sur puce sont en cours de développement, d'évaluation et d'intégration et permettent une compréhension mécaniste de la toxicité. L'objectif ultime est de parvenir à une meilleure protection de la santé humaine et de l'environnement tout en soutenant l'innovation et la compétitivité industrielle de l'UE, sans l'utilisation d'animaux. Le développement et l'utilisation de modèles et de méthodes non animaux sont également essentiels pour faire progresser la recherche fondamentale, appliquée et translationnelle. L'éducation joue également un rôle essentiel en permettant un passage aux méthodes non animales par l'introduction des 3R dans les programmes d'enseignements secondaires et les programmes d'enseignements supérieurs.

c. Processus de validation des méthodes alternatives

Les autorités réglementaires sont chargées par la loi de protéger la santé humaine et l'environnement. L'objectif de la validation est de s'assurer que les organismes d'évaluation sanitaire obtiennent des renseignements fiables et utiles pour leur prise de décisions, et que les données générées puissent être échangées et mutuellement acceptées entre les pays.

Les tests animaux n'ont pas eu à passer de tests de validation et se sont imposés comme les tests de référence (ou *gold standards*). Le procès des médecins nazis devant le tribunal militaire américain à Nuremberg a abouti à l'élaboration du code de Nuremberg, en août 1947. Son article 3 indique que « *les fondements de l'expérience doivent résider dans les résultats d'expériences antérieures faites sur des animaux, et dans la connaissance de la genèse de la maladie ou des questions de l'étude, de façon à justifier par les résultats attendus l'exécution de l'expérience.* »(81) Autrement dit, pas question de tester directement un traitement chez des malades sans s'être assuré au préalable que le bénéfice potentiel sera supérieur aux risques encourus, ce qui est devenu depuis une obligation légale. Au contraire les tests alternatifs doivent faire leurs preuves lors de processus de validation. Qu'elles soient basées sur des tests *in chemico*, *in vitro*, des modèles informatiques ou une combinaison de différents types de tests (appelée approche IATA), les méthodes validées peuvent être utilisées pour déterminer les propriétés des produits. Cela concerne donc les substances pharmaceutiques mais aussi les cosmétiques, les produits ménagers, l'alimentation et la fabrication industrielle.

Dès 1990, le premier groupe de travail organisé par le CAAT et l'ERGATT a développé une première définition de validation puis de prévalidation, la notion de modèle de prédiction statistique et la première structure de gouvernance en 1994 (82).

En Europe, le Centre européen de validation des méthodes alternatives (ECVAM) a été créé en 1991 dans le cadre du Centre commun de recherche (CCR) de la Commission européenne, pour répondre à l'exigence de la directive originale de l'UE sur la protection des animaux à des fins scientifiques et encourager le « *développement et la validation de techniques alternatives* ». (57) Cela a été suivi aux États-Unis par la création en 1997 de l'*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM), puis au Japon en 2005 avec la création du *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods* (JaCVAM). Reflétant la prise de conscience croissante de l'importance de la validation dans le monde entier, des principes de validation internationalement reconnus ont été adoptés par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE)¹¹ en 2005(83). Plus récemment, la mise en œuvre de la directive européenne 2010/63 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (directive 2010/63/UE 2010), entrée pleinement en vigueur en 2013, a renforcé l'engagement de l'Europe à placer les 3R au cœur de

¹¹ L'OCDE est une organisation intergouvernementale réunissant 30 pays industrialisés d'Amérique du Nord, d'Europe et de la région Asie-Pacifique ainsi que la Commission européenne afin de coordonner et d'harmoniser leurs politiques, d'examiner des questions d'intérêt commun et de coopérer à la résolution de problèmes internationaux.

la politique de l'UE et de renforcer les dispositions législatives afin de réduire autant que possible le recours aux procédures animales dans différents contextes. En outre, d'autres pays ont depuis également établi des centres nationaux pour la validation des méthodes alternatives, tels que le *Centre sud-coréen pour la validation des méthodes alternatives* (KoCVAM) créé en 2010 et le *Centre brésilien pour la validation des méthodes alternatives* (BraCVAM) créé en 2011.

Sur la base des expériences acquises lors d'études d'évaluation multi-laboratoires et avec le concours de divers experts internationaux, l'ECVAM a publié sous la direction de Michael Balls, des recommandations sur les principes, les aspects pratiques et logistiques de la validation des méthodes alternatives (84–86). Ces documents représentent les premiers principes de base pour la validation de méthodes alternatives comprenant la gestion et la conception d'une étude de validation qui ont ensuite été intégrés dans les recommandations internationales de l'OCDE (83).

La démonstration de la validité scientifique d'une méthode *in vitro* est généralement requise pour son utilisation dans le cadre réglementaire, en remplacement, en réduction ou en affinement des tests sur les animaux. (83,87)

Une fois validée, une méthode est incluse dans les Lignes directrices de l'OCDE. Les lignes directrices (élaborées à la suite des études de validation) et les documents d'orientation qui les accompagnent ont pour but de fournir suffisamment de détails pour permettre à toutes les études d'être reproduites dans n'importe quel laboratoire ayant les moyens techniques.

En parallèle, les laboratoires mettent continuellement au point de nouvelles méthodes pour caractériser la toxicité (comme les méthodes *in vitro* ou la toxicogénomique). Mais sans validation, il est compliqué de les utiliser d'un point de vue réglementaire : il est nécessaire d'avoir une assurance sur la méthode elle-même pour prendre des décisions scientifiquement valides.

Une méthode alternative pour le remplacement (total ou partiel) d'un essai animal est schématiquement défini comme la combinaison (Figure 11) :

- D'un « système d'essai », c'est-à-dire le moyen de générer des données (physico-chimiques ou *in vitro*) pour la substance d'intérêt,
- Et d'un « modèle de prédiction » (88).

Le modèle de prédiction interprète les données et apporte une conclusion (une « prédiction » toxicologique) qui permettra d'orienter les décisions lors du processus d'acceptation. Les données d'entrées sont généralement obtenue *in vitro* ou *in chemico* (données physicochimiques).

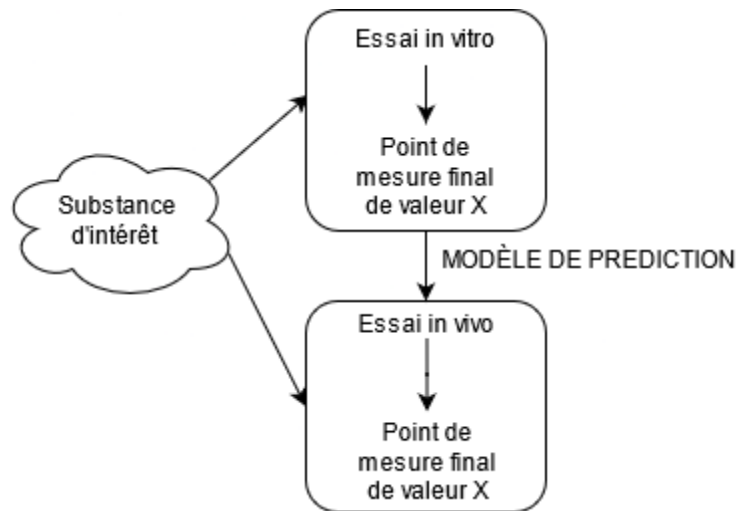


Figure 11 Schématisation d'une méthode alternative

Pour être validée, une méthode alternative doit répondre à plusieurs exigences. (83,84,89,90)

- La définition du test

Le « but » de la méthode alternative doit être bien défini selon son application prévue (par exemple, l'essai concerne-t-il une toxicologie spécifique comme l'irritation des yeux ?). Le protocole doit être décrit sous forme de SOP (*Standard Operating Procedure*) détaillant chaque étape et chaque manipulation. L'essai doit intégrer des contrôles positifs et négatifs et définir préalablement les mesures acceptables pour le critère étudié (appelé *endpoint* ou point de mesure finale (Figure 11)). Des critères de performance visés doivent aussi être fixés à l'avance pour une étude prospective de validation.

Ensuite le système de test doit reposer sur une base scientifique solide, il faut donc documenter au mieux la base mécanistique en jeu dans le déroulement des événements moléculaires impliqués.

Enfin, les limites intrinsèques du test utilisé doivent être évaluées. La connaissance de l'incertitude par exemple doit être qualifiée et quantifiée.

La fiabilité :

La fiabilité fait référence à la reproductibilité des résultats des tests, à la fois au sein d'un même laboratoire et entre les laboratoires, et dans le temps. Deux concepts doivent être cependant distingués : la notion d'incertitude et la notion de variabilité.

- La notion d'incertitude est liée au niveau de la connaissance des mécanismes d'action, de la qualité de données et de la pertinence des tests. Par exemple, l'incertitude des méthodes *in silico* est souvent mal caractérisée en raison de l'insuffisance des bases de données.
- La notion de variabilité reflète les différences de résultats obtenus pour un même test lorsqu'il est répété, ou entre deux échantillons d'une même substance (voire d'un même lot) ou encore entre deux laboratoires. Ces variabilités peuvent être d'origine technique (entre deux

expérimentateurs par exemple), biologique (différences de conditions de cultures cellulaires ou d'hébergement des animaux etc...).

S'assurer de la qualité des protocoles ainsi que de la conformité obligatoire des procédures de laboratoire aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) permet de diminuer ces variabilités.

La pertinence :

Dans le contexte d'une méthode alternative de remplacement, la pertinence fait référence à la base scientifique du système d'essai et à la capacité prédictive de la méthode alternative par rapport à une méthode de référence. Les prévisions doivent être suffisamment précises pour être utilisées.

Pour permettre d'atteindre ces objectifs, il faut enfin s'assurer de l'indépendance dans la gestion de l'étude, de la sélection minutieuse des substances actives et de la qualité de la collecte des données et de l'analyse statistique.

En outre, un programme de pré-validation est recommandé pour garantir qu'une méthode incluse dans une étude de validation formelle remplit de manière adéquate les critères nécessaires, de sorte que les ressources financières et humaines soient utilisées le plus efficacement possible avec une plus grande probabilité de réussite.

En 2004, une « *Approche modulaire des principes ECVAM sur la validité des tests* » a été proposée par Thomas Hartung (actuel directeur du CAAT) dans le but de rendre le processus de validation plus flexible en décomposant les différentes étapes de validation en sept modules indépendants, et en définissant pour chaque module les informations nécessaires à l'évaluation de la méthode d'essai (91). L'un des principaux avantages de l'approche modulaire est la possibilité de compléter les différents modules dans n'importe quel ordre, permettant l'utilisation de données à la fois recueillies rétrospectivement et générées prospectivement selon les besoins. Cette approche a le potentiel d'augmenter les preuves recueillies sur une méthode alternative tout en réduisant le temps nécessaire au recueil des données si seules des données prospectives devaient être prises en compte. Les sept modules sont :

- a. Définition des tests ;
- b. Reproductibilité intra-laboratoire ;
- c. Transférabilité ;
- d. Reproductibilité inter-laboratoires ;
- e. Capacité prédictive ;
- f. Domaine d'applicabilité ;
- g. Définition des normes de performance.

La validation étant une étape importante dans l'acceptation réglementaire, des efforts internationaux ont été entrepris pour favoriser l'harmonisation de ses processus dans le but ultime de promouvoir une acceptation internationale et la reconnaissance des méthodes alternatives. En particulier, grâce à un processus de consultation avec les

organismes de validation et les principales parties prenantes, l'OCDE a adopté des critères de validation convenus au niveau international pour l'acceptation réglementaire des méthodes alternatives. Ces principes internationalement reconnus sont décrits dans le document d'orientation de l'OCDE n° 34 sur « *La validation et l'acceptation internationale des méthodes d'essai nouvelles ou actualisées pour l'évaluation des risques* »(92).

Les lignes directrices de l'OCDE sont couvertes par la décision du Conseil de l'OCDE sur l'acceptation mutuelle des données (MAD). Elles précisent que les données de test générées dans tout pays membre ou partenaire doivent être conformes aux BPL et aux lignes directrices. Ainsi, les données conformes doivent être aussi acceptées par les autres pays membres et partenaires à des fins d'évaluation sanitaires (83). Cette décision minimise les coûts associés aux tests de substances pharmaceutiques en évitant les tests en double et permet d'utiliser plus efficacement les équipements spécifiques (nécessitant une main-d'œuvre spécialisée ou pour des tests rarement effectués).

d. Aspects pratiques de la conception et de la conduite d'études de validation

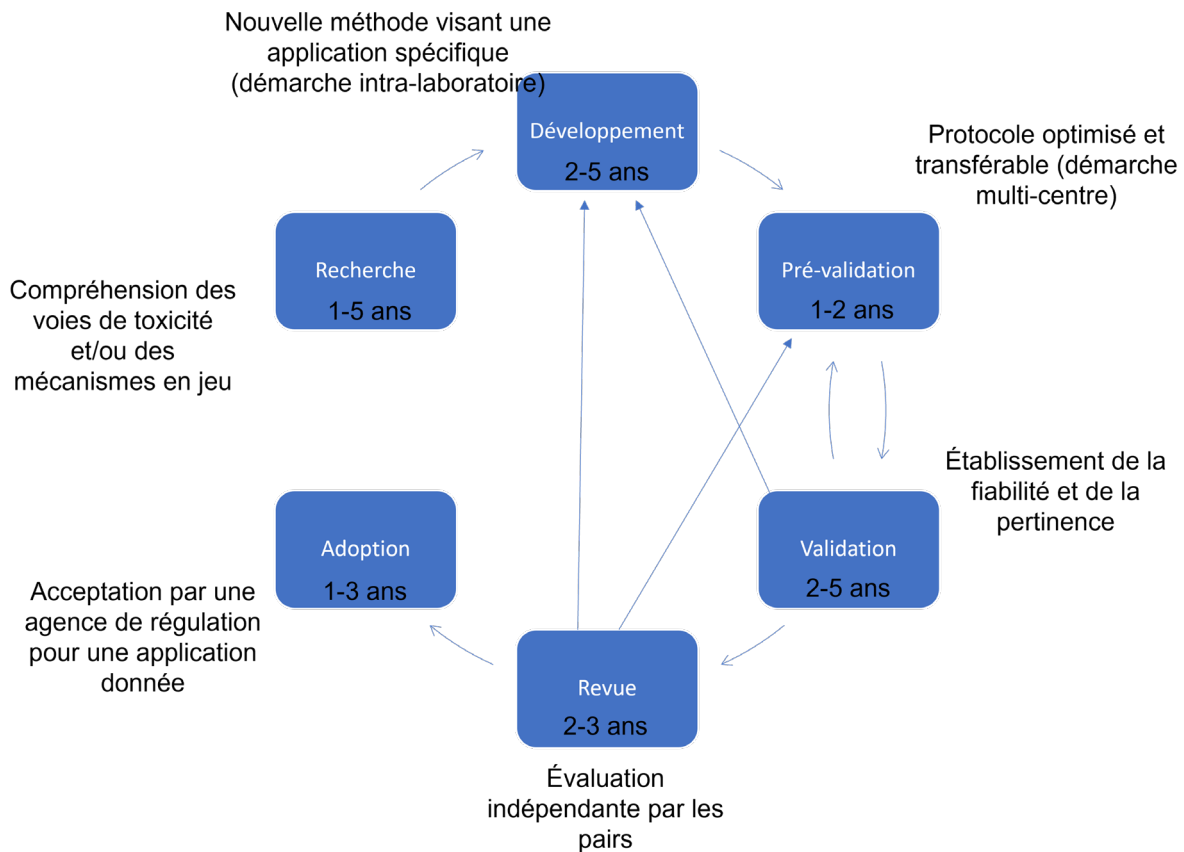


Figure 12 Étapes de la validation des méthodes alternatives par l'EURL-ECVAM

En pratique la validation se réalise en quatre grandes étapes (Figure 12 et 13) :

- La soumission de la méthode à la commission EURL ECVAM se fait en deux étapes : une pré-soumission évalue la pertinence de la méthode d'après la rigueur scientifique et la rigueur réglementaire et lorsque l'évaluation est positive un document détaillé de la méthode est alors demandé (*Full Test Submission*)
- Le plan de validation est établi et réalisé en collaboration entre l'EURL ECVAM et l'EU-Netval (*réseau de laboratoires européens dédié à la mise en œuvre des études collaboratives de validation*) (Figure 13)
- Le rapport d'évaluation est évalué par le comité consultatif scientifique d'EURL-ECVAM et donne lieu à un rapport scientifique
- L'EURL-ECVAM émet ses commentaires puis le projet est mis en ligne pour consultation publique. Une fois finalisée, la méthode est publiée sur le site d'EURL-ECVAM. La méthode validée est ensuite adoptée au niveau de l'OCDE en une ligne directrice

Dans les domaines de l'irritation et de la corrosion cutanées, de l'irritation oculaire, de la phototoxicité, de la sensibilisation cutanée, de la toxicocinétique et de la génotoxicité, de nombreuses méthodes alternatives ou de réductions ont pu être validées au niveau international (annexe 1).

D'autre part, dans des domaines plus complexes tels que la toxicité chronique, la toxicité pour la reproduction, la cancérogénicité et l'interférence endocrinienne, il est nécessaire de dépasser le concept de substitution et d'utiliser de nouveaux outils : l'AOP pour *Adverse outcome pathway* et l'IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*). Ces méthodes se basent sur une connaissance mécanistique des voies toxicologiques et une optimisation des plans d'études à travers différentes méthodes.

La ligne directrice ICH M3 (R2) « *Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trial and marketing authorization for pharmaceuticals-CPMP/ICH/286/95* » ainsi que la ligne directrice « *Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human and early clinical trials with investigational medicinal products-EMA/CHMP/SWP28367/07 Rev* » indiquent les principes généraux relatifs aux études non cliniques requises pour les essais cliniques chez l'être humain.

Les médicaments-candidats issus des biotechnologies et les médicaments anticancéreux qui répondent respectivement aux lignes directrices ICH S6(R1) et ICH S9, et d'autres toxicités spécifiques doivent être évaluées (toxicité mitochondriale des inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase du VIH, potentiel cancérogène et reprotoxique des analogues d'insuline humaine, etc.).

Actuellement, le remplacement total des essais précliniques en garantissant la sécurité des patients est impossible. La conception expérimentale des essais précliniques est l'étape cruciale à optimiser. Le plan d'étude doit se focaliser sur l'objectif global de sécurité du patient, il ne s'agit pas d'un ensemble de tests à valider mais une démonstration du bénéfice/risque à démontrer (13).

Le développement des protocoles des essais sur les animaux manque souvent de rigueur et les rapports finaux des études ne sont pas suffisamment détaillés.

Les études sur les animaux sont complexes et difficiles à planifier et à mener correctement en raison de la variabilité inhérente aux systèmes biologiques et aux manipulateurs (les soins et la manipulation des animaux peuvent affecter la qualité des études).

De plus, le protocole doit avoir suffisamment de détails pour décrire les principales causes de variations attendues dans une expérience et les méthodes utilisées pour les minimiser. Mettre au point un protocole de qualité nécessite alors une équipe de spécialistes à l'expertise variée dès la genèse du projet : biostatisticiens, experts en science des animaux de laboratoire, pathologistes, etc. en plus des personnes directement impliquées dans l'étude (13,94). Ainsi l'hypothèse expérimentale à tester et les objectifs expérimentaux sont discutés préalablement entre les spécialistes.

Le modèle à étudier ainsi que la conception expérimentale de base et les points finaux à utiliser sont discutés et débattus.

Dans l'étape suivante, avec l'aide de statisticiens et d'autres experts en la matière, un protocole détaillé est élaboré. À ce stade, les facteurs responsables des principales sources de variations anticipées sont discutés ainsi que les méthodes pour contrôler la variation et atténuer le biais. Dans les dernières étapes de la genèse du protocole, les préoccupations logistiques de l'étude sont discutées avec ceux qui sont effectivement responsables de la conduite de l'étude (scientifiques de laboratoire, responsables de laboratoire, personnel technique de soins aux animaux, etc.).

Dans le même temps, il est souhaitable de réaliser une analyse de risque des différentes étapes de l'étude. Cela consiste à déterminer les phases les plus critiques, afin que les ressources et les méthodes de supervision appropriées puissent être affectées. On peut citer comme étape critique tout mouvement d'animaux ou d'équipement, réalisation de nouvelles procédures, périodes de vacances, nouvel opérateur etc...

Il est également extrêmement important de déterminer les méthodes à utiliser pour minimiser les biais lors de l'étude. Il existe de nombreuses sources potentielles de biais à considérer dans toutes les phases de l'étude, de la conception à l'interprétation (95). Dans un certain nombre de domaines thérapeutiques, des meilleures pratiques sont formulées pour faire progresser la valeur translationnelle des études précliniques (7,96,97).

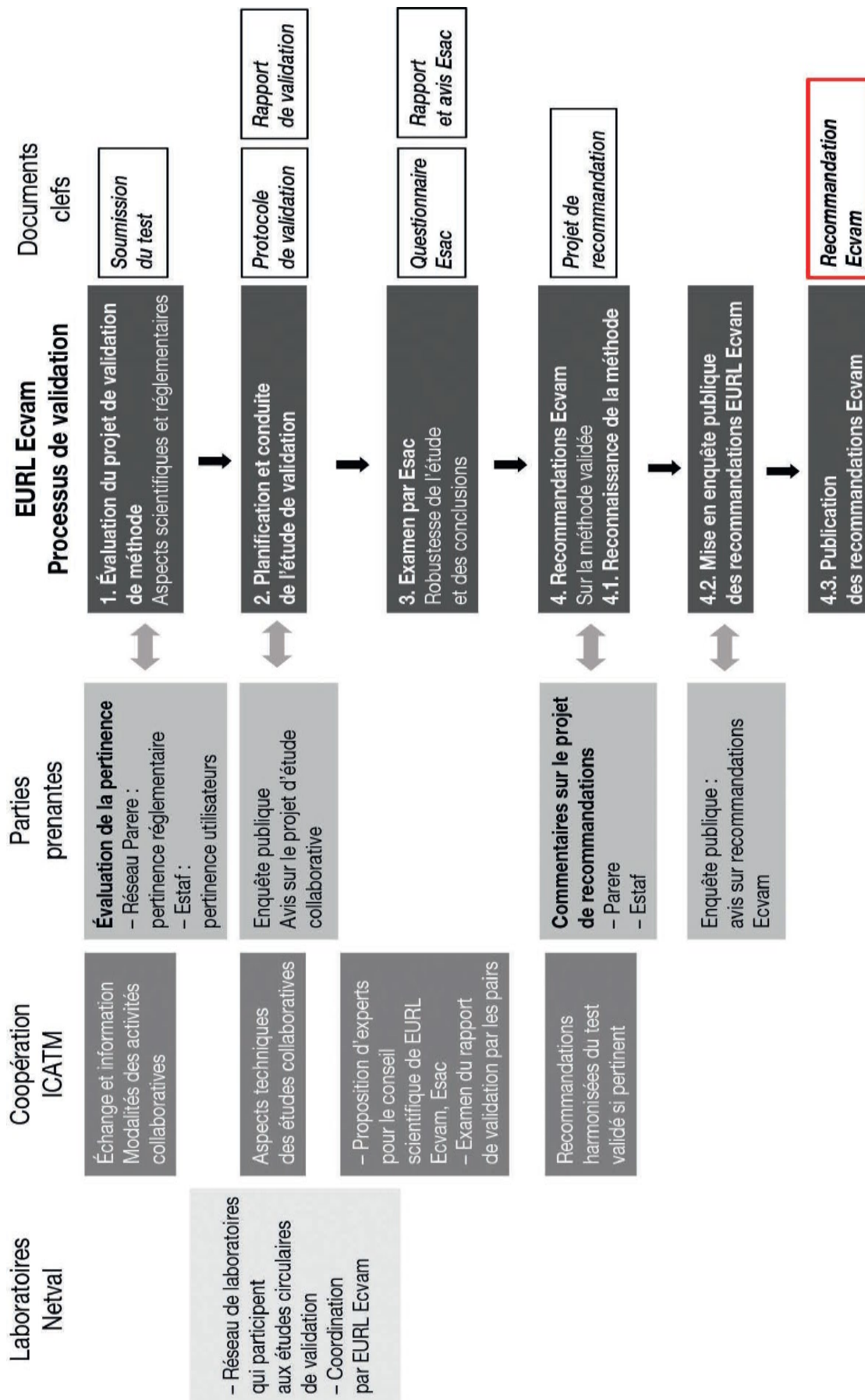


Figure 13 Processus de validation d'une méthode alternative à l'expérimentation animale

5. Les tests non animaux

La diversité des organismes-modèles disponibles présente des avantages multiples et complémentaires. Des modèles simples permettent de définir des mécanismes moléculaires impliqués dans certaines pathologies et d'envisager des voies de thérapie. Les modèles plus intégrés permettent, eux, de comprendre les interactions complexes menant à la pathologie.

a. Les techniques *in vitro*

Une technique est dite *in vitro* (littéralement « dans le verre ») lorsque l'essai est réalisé en dehors d'un organisme vivant. En pratique, il s'agit d'utiliser des tissus, des organes ou des cellules isolées.

Les méthodes *in vitro* sont de plus en plus utilisées lors des étapes de *screening* et du développement du médicament. Leur facilité de mise en œuvre, leur isolement de tout contexte physiologique permettant d'étudier un mécanisme d'action toxique, et surtout la possibilité d'utiliser des cellules humaines qui permettent de s'affranchir des différences interspèces, en font un outil incontournable. Ce dernier point est particulièrement vrai pour les cellules hépatiques. En effet, si les différences de réponse interspèces sont limitées en termes de cardiotoxicité ou d'hématotoxicité, elles sont fréquentes pour une hépatotoxicité (46).

Exemple de l'hépatotoxicité : Près du tiers des molécules qui se révèlent hépatotoxiques dans les essais cliniques ne provoque aucune lésion hépatique chez l'animal (46). Cette faible corrélation dans le cas du foie est principalement due à des différences dans les voies et les cinétiques de biotransformation des médicaments et aux variations individuelles dans la réponse humaine, liée à des facteurs génétiques, physiopathologiques et/ou environnementaux.

Les modèles hépatiques humains sont donc *à priori* les plus pertinents pour l'acquisition de données ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion). Ils incluent des systèmes cellulaires (tranches de foie, hépatocytes primaires et lignées de cellules hépatiques) et subcellulaires (fractions S9, microsomes, enzymes recombinantes), chaque modèle ayant ses propres intérêts et limites pour préciser les paramètres cinétiques ou établir le profil métabolique d'une molécule, caractériser les enzymes impliquées dans sa biotransformation, démontrer une inhibition ou une induction enzymatique ou encore prédire d'éventuelles interactions avec d'autres composés. Ces données sont aujourd'hui requises par les agences réglementaires et des recommandations sont publiées par la FDA (*Food and Drug Administration* aux États-Unis). Dans l'ensemble on observe une bonne corrélation avec les résultats *in vivo*.

Qu'il s'agisse de prédiction ou de mécanismes d'action, l'hépatotoxicité ne peut logiquement être évaluée qu'à partir de cellules humaines compétentes sur le plan métabolique. Jusqu'ici les études *in vitro* ont surtout été réalisées à partir d'hépatocytes en cultures primaires¹², à des concentrations élevées et avec des calculs de CI50 (concentration inhibitrice médiane) réalisés à l'aide de tests conventionnels. Mais les

¹² Les hépatocytes en culture ont pour caractéristiques de ne pas proliférer et d'avoir un phénotype instable. Lorsque ces cellules sont cultivées dans un milieu nutritif basal, elles adhèrent à leur support mais ne se multiplient pas : les hépatocytes sont alors maintenus en culture primaire.(98)

différences entre les hépatocytes, qu'elles soient morphologiques ou métaboliques ainsi que la sensibilité variable de ceux-ci ont conduit à des résultats discutables. A l'heure actuelle, il n'existe toujours pas de méthode de référence pour l'évaluation de la toxicité aiguë. Les hépatocytes en cultures primaires ont aussi permis de reproduire certains types de toxicité, comme la formation de métabolites réactifs (par exemple lors de la prise de paracétamol), la phospholipidose (amiodarone, maléate de perhexiline) ou des altérations de type cholestatique. Ils ne sont cependant pas adaptés pour détecter une stéatose caractérisée par l'accumulation de vésicules lipidiques intracytoplasmiques, une fibrose ou une toxicité de type idiosyncratique (par définition imprévisible) apparaissant après des traitements longs et répétés.

Si l'hépatocyte est la cible majeure d'un médicament, il convient aussi d'étudier d'éventuelles toxicités dans d'autres tissus (rénal, pulmonaire, nerveux...). On utilise plusieurs modèles cellulaires primaires et certaines lignées sont représentatives du néphron *in vivo*. En revanche, les modèles *in vitro* existants ne permettent pas d'évaluer correctement le potentiel neurotoxique de composés chimiques.

Dans l'attente du développement de nouvelles stratégies, les cellules HepaRG, une nouvelle lignée d'hépatome humain, semblent représenter aujourd'hui le modèle le plus pertinent pour des études de toxicité hépatique aiguë et chronique. Elles possèdent à la fois la capacité de biotransformation des hépatocytes humains primaires et le potentiel de croissance indéfinie des lignées d'hépatome. Ces cellules HepaRG permettront donc probablement de reproduire *in vitro* des lésions hépatiques consécutives à des traitements chroniques comme une stéatose.

De nouvelles approches reposant sur l'utilisation de puces à cellules couplée à l'imagerie sont en cours de validation. Ces puces nécessitent peu de cellules (quelques centaines par point) et permettent de visualiser 3 ou 4 marqueurs par cellule. Un tel équipement est actuellement utilisé pour le *screening* de nouvelles molécules anticancéreuses, notamment dérivées d'algues.

i. Les tests cellulaires

Une culture cellulaire consiste à maintenir en vie les cellules extraites de leur milieu biologique d'origine dans un environnement synthétique fournissant les des conditions *in vitro* appropriées (99). Les cellules ainsi cultivées sont capables de proliférer et de reproduire le fonctionnement et le métabolisme spécifique qu'elles avaient dans leur tissu d'origine.

Le terme "tests cellulaires" regroupe de nombreuses réalités. Une définition générale serait "ensemble des approches qui utilisent la cellule comme support d'information à des fins de mesures".

L'utilisation combinée de systèmes de lignées cellulaires et de modèles animaux classiques pour la recherche biomédicale à la fin du XXe et au début du XXIe siècle a été couronnée de succès dans de nombreux domaines, notamment dans la compréhension des voies de signalisation cellulaire, l'identification de cibles médicamenteuses potentielles mais aussi pour guider la conception de candidats médicaments pour les pathologies, y compris le cancer et les maladies infectieuses.

L'émergence d'approches de culture cellulaire 3D *in vitro* humaine utilisant des cellules souches de différents organes ont donc reçu une large attention, ayant le potentiel de surmonter les limitations des modèles animaux. Les tentatives de modéliser la biologie des organes humains ont été faites avant l'émergence d'organoïdes qui ont montré leur potentiel comme modèle biomédical. Ces tentatives comprennent la différenciation des cellules souches humaines en 2D, en présence ou en l'absence d'une matrice 3D ; la bio-impression de cellules humaines ; et la culture de cellules dans un dispositif micro fluidique («organ-on-a-chip»). Ces approches ont permis, d'après le GIRCOR¹³, de « réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques de 40 % depuis 1990 en France ».

ii. Les cultures cellulaire « classiques »

Les premières applications de cultures cellulaires avec succès ont été rendues possibles grâce aux célèbres cellules HeLa : dans les années 1950 George et Margaret Gey sont parvenus à mettre en culture et à faire croître des cellules issues de cellules tumorales du cancer du col de l'utérus de **Henrietta Lacks**.

Les premières techniques de dissociation enzymatique ont été mises au point afin d'obtenir une suspension de cellules isolées pouvant êtreensemencées dans des boîtes de culture. Les cellules sont placées dans un milieu spécifique adapté à leurs besoins nutritifs et leurs contraintes physiologiques. Ce milieu de « base » est composé :

- D'eau
- D'acides aminés, essentiels à la croissance cellulaire
- De glucose, source d'énergie
- De sels minéraux permettant le maintien du potentiel de membrane et l'osmose
- D'oligoéléments, comme du fer ou du zinc
- De vitamines cofacteurs d'enzymes
- Et parfois accompagné de solution tampon (pour fixer le pH), de facteurs de croissances (généralement du sérum de veau fœtal dont la composition est variable selon les lots mais on peut aussi retrouver du sérum humain ou du lysat plaquettaire), des agents de différenciation, de stimulation ou encore des facteurs d'attachement (fibronectine, laminine) et des antibiotiques ainsi que des antimycotiques.

Les cultures se font dans un milieu contrôlé : des incubateurs humidifiés réglés à 37°C permettant un apport en CO₂. Les besoins physiologiques des cellules nécessitent un monitoring :

- De la température : le nombre de division cellulaire est proportionnel à la température jusqu'à une limite où la température inhibe la prolifération :

¹³ Le Gircor est une association française regroupant les instituts de recherche biomédicale publics et privés ainsi que les entreprises du médicament qui a pour but d'informer sur la recherche animale afin que le public puisse bâtir son opinion sur ce sujet en connaissance de cause.

la température utilisée pour les cultures cellulaires est généralement celle du corps humain (37°C)

- De l'humidité : le milieu est proche de la saturation en eau (90-95%) pour éviter l'évaporation des milieux de culture et l'augmentation de pression osmotique
- Du CO₂ : l'apport de CO₂ gazeux (5% de CO₂) est nécessaire à la croissance cellulaire et à l'équilibre bicarbonate/acide carbonique
- Du pH : la croissance des cellules est optimale à pH physiologique entre 7,35 et 7,45. Pour maintenir un pH entre 7,2 et 7,4 généralement utilisé en cultures cellulaires, le milieu est tamponné (par exemple l'HEPES)
- De l'osmolarité : en plus du maintien de l'humidité, l'osmolarité est ajustée avec du NaCl.

Sur les plus de 200 types cellulaires présents chez l'Homme, les études se porteront sur une sélection de types cellulaires selon :

- La voie d'exposition étudiée : les cellules épidermiques pour une application cutanées, les cellules de la muqueuse respiratoire pour la voie respiratoire (par inhalation) ou encore les cellules intestinales dans le cas d'une voie *per os*.
- Les organes cibles potentiels tels que le foie et le rein qui joueront un rôle dans la métabolisation et sont de fait des cibles critiques en termes de toxicité.

Les lignées cellulaires

Les cultures cellulaires offrent de nombreux avantages : les lignées cellulaires se multiplient activement permettant à ces cultures d'être entretenues pendant de longues années par des repiquages successifs, être congelées et décongelées et nécessitent une technologie simple.

On rencontre différents types de lignées cellulaires :

- **Les cultures dites définies** : ce sont des cellules « classiques » différenciées et prélevées chez un organisme et mis en culture. Les cellules ne se multiplient que pendant un nombre limité de générations (30 à 50 repiquages) puis meurent : leur vie et leur mort sont programmées. C'est ce qui est appelé la limite de Hayflick (100)(Figure 14).

D'une manière générale, ces cultures de cellules évoluent en 3 phases :

- La culture primaire : les cellules mettent plusieurs jours pour se multiplier
- La culture secondaire : les cellules s'adaptent à leur milieu et se multiplient plus vite. Cette étape est fréquemment accompagnée d'un phénomène de dédifférenciation des cellules, c'est-à-dire la perte des fonctions qu'elles avaient dans leur environnement physiologique.

Dans l'exemple des hépatocytes primaire ci-dessus, l'expression des enzymes de métabolisation des hépatocytes diminue jusqu'à disparaître lorsque les cellules sont mises en culture : la multiplication cellulaire prend le pas sur les fonctions spécifiques des cellules.

- Enfin on observe une diminution de la vitesse de multiplication des cellules, c'est la phase de sénescence, puis les cellules déclinent (mort cellulaire ou apoptose).

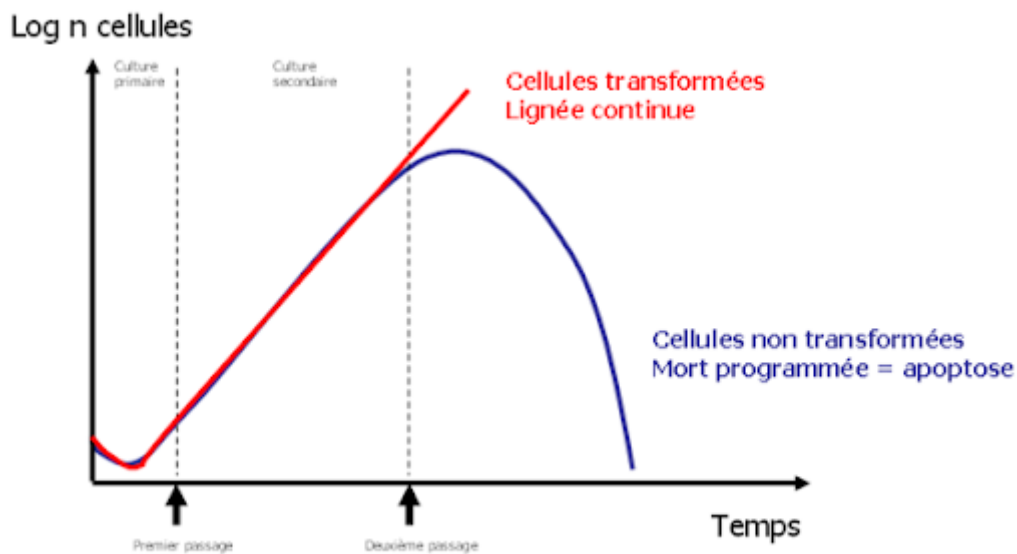


Figure 14 Evolution du nombre de cellules en culture cellulaire au cours du temps

Pour pallier les changements phénotypiques cellulaires des cultures en deux dimensions, des modèles de culture en trois dimensions sont de plus en plus développés.

Une autre difficulté de ce type de culture est l'approvisionnement en cellules humaines qui sont obtenues par biopsies et requiert des autorisations auprès d'hospitaliers pour tester des cellules de différents donneurs et intégrer la variabilité interindividuelle.

- **Les cultures de lignées transformées ou immortelles dites continues** : leur pouvoir multiplicatif est important et ne diminue pas ce qui permet de réaliser un nombre de repiquage infini dans de bonnes conditions de cultures. Ces cellules perdent leur propriété d'inhibition de contact (c'est-à-dire qu'au lieu de se multiplier jusqu'à former une couche simple, elles se cultivent en amas), s'arrondissent, ont régulièrement un nombre de chromosomes anormal (hétéroïdie) et les cellules non adhérentes peuvent être cultivées en suspension (plus besoin d'ancrage sur une matrice).

La création de telles lignées est possible par différentes méthodes :

- À la suite d'une modification rare spontanée des cellules en culture primaire.
- Par prélèvement de cellules tumorales : ces cellules sont immortelles (comme les cellules HeLa).
- Par création d'hybridomes : immortalisation par fusion membranaire entre une cellule normale et une cellule immortelle
- Par transfection dans une cellule normale d'un oncogène viral (par exemple le virus SV40 ou l'EBV).

Les lignées peuvent être aussi transfectées par un gène rapporteur modifié pour étudier les effets d'une substance sur l'activité d'un promoteur d'intérêt. On peut utiliser par exemple le gène codant pour la luciférase avec le gène d'intérêt dont l'émission de luminescence est quantifiable.

Les cellules ayant des caractéristiques, notamment chromosomique, différentes des cellules normales, il conviendra de choisir ces cellules pour des tests de toxicité

généraux en prenant en compte les nombreuses mutations et les pertes de parties de chromosomes aboutissant à des lignées hétérogènes.

Les cellules souches

Les cellules souches sont dotées de propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation en différents types cellulaires (Figure 15).

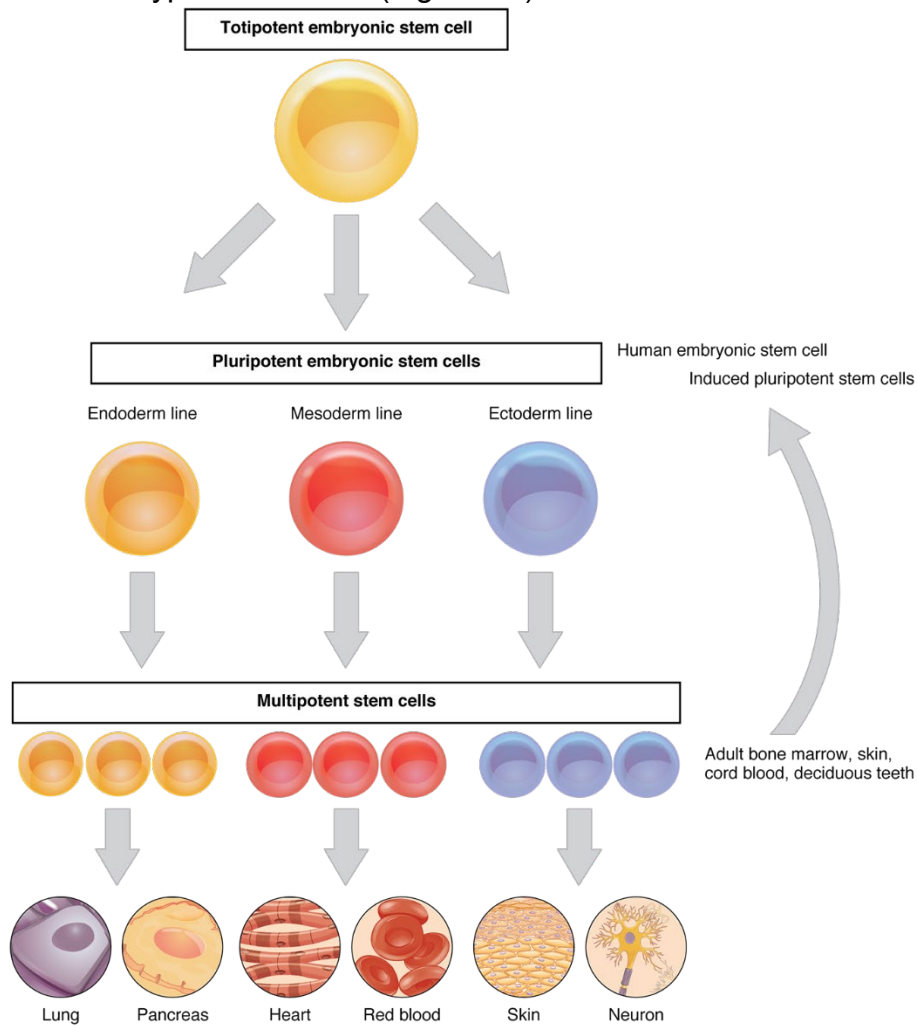


Figure 15 Propriétés des cellules souches et différenciation

Elles apparaissent donc comme une alternative prometteuse aux cultures primaires (101). Elles peuvent être d'origine embryonnaire donc prélevée sur un blastocyste (les 7 premiers jours de l'embryon) ce qui soulève des questionnements éthiques. Des cellules souches pluripotentes peuvent aussi être prélevées sur les cordons ombilicaux. Une autre technologie a été mise au point pour permettre à une cellule somatique prélevée chez un adulte de devenir souche : les iPS.

Cas particulier de la technologie des cellules iPS humaine

Les premières cellules souches pluripotentes humaines, les cellules souches embryonnaires ou CSE, ont été décrites en 1998, près de deux décennies après la découverte initiale de lignées cellulaires pluripotentes murines en 1981. Cependant, la

production de ces lignées humaines nécessitant le sacrifice d'embryons humains au stade blastocyste, leur utilisation a soulevé de fortes préoccupations éthiques.

En 2007, le débat autour des cellules souches humaines a été largement contourné par l'introduction de la technologie iPS humaine, qui convertit un fibroblaste différencié ordinaire d'un humain adulte en une cellule pluripotente. La reprogrammation à un état pluripotent est généralement réalisée par expression forcée d'un ensemble spécifique de facteurs de transcription, et les cellules pluripotentes peuvent ensuite être différenciées en types de cellules spécifiques. La technologie iPS a non seulement permis la génération de cellules souches spécifiques aux patients, mais a également permis aux chercheurs de travailler avec un approvisionnement illimité de cellules souches humaines et de tissus dérivés de cellules souches. De plus, la technologie iPS permet la mise en banque de cellules souches issues de patients. Il existe encore des limitations techniques lors de l'utilisation des iPS. Ces limites sont liées à la reprogrammation : l'utilisation d'oncogènes, son instabilité et sa faible efficacité. Tous ces obstacles techniques ont rendu difficile l'obtention de lignées iPS sans erreur auprès des patients.

Mais ces limitations ont été au moins en partie surmontées par l'utilisation de vecteurs non intégrateurs et de protocoles de contrôle de qualité standardisés pour éviter ou éliminer les altérations génétiques indésirables. La variabilité d'une lignée à l'autre causée par l'hétérogénéité génétique des humains a également été résolue par l'utilisation de contrôles isogéniques générés par génie génétique utilisant la technologie CRISPR – Cas9.

Ces améliorations ont permis aux chercheurs d'utiliser des types de cellules spécialisées dérivés de l'iPS - par exemple, les neurones, les cardiomyocytes, les cellules progénitrices hématopoïétiques et les cellules β pancréatiques - dans la modélisation des maladies et le dépistage de médicaments. Cependant, un peu plus d'une décennie après leur introduction, les méthodes de culture d'organes 3D ont considérablement augmenté l'utilité des iPS humains.

Le choix du type cellulaire

Le choix du type cellulaire dépendra de l'objectif des essais. Dans le cadre d'une étude toxicologique de screening (donc sur un très grand nombre de molécules), les lignées cellulaires apparaissent comme la méthode la plus rapide et la moins coûteuse pour caractériser la toxicité, sur la base d'une série de critères ciblant des fonctions cellulaires clés : mort cellulaire, prolifération, dommages à l'ADN, stress oxydant, homéostasie calcique, fonctions mitochondriales, etc. Ces tests peuvent être automatisés pour réaliser un criblage à haut débit.

Par exemple, Tox 21 (21 pour 21^{ème} siècle) est une collaboration de recherche fédérale américaine axée sur le développement de nouvelles méthodes d'évaluation de la toxicologie des produits chimiques, des pesticides, des additifs alimentaires et des substances médicamenteuses. Lors de ce projet, des plateformes robotisées ont été mises en place par l'EPA (*Environmental Protection Agency*) ce qui a permis l'étude *in vitro* de la toxicité de 10 000 substances à 15 concentrations différentes, au travers de 70 tests différents couvrant 125 processus biologiques.

Pour une meilleure caractérisation des mécanismes de toxicité, on réalise les essais dans des conditions les plus proches de celles rencontrées dans l'environnement physiologique et lors de l'exposition. De plus pour prendre en compte la variabilité entre les individus et améliorer la reproductibilité, les cellules primaires utilisées proviennent de différents donneurs.

Les limites :

Les conditions de culture ne sont pas homéostatiques :

- Le milieu est progressivement appauvri en éléments nutritifs
- Les déchets métaboliques des cellules s'accumulent peu à peu

Une autre limite peut être la capacité de la substance étudiée à se lier de façon non spécifique aux milieux et plastiques de culture, s'évaporer ou encore se dégrader au cours de l'exposition. Les relations dose-réponse peuvent alors conduire à une sous-estimation de la toxicité, car la dose biologiquement effective est inférieure à la dose nominale appliquée.

Les conditions de culture ne sont pas physiologiques en termes de matrice extracellulaire et de densité cellulaire. Un seul type cellulaire étant utilisé, on ne tient pas compte des interactions cellulaires.

Un certain nombre de ces limites ont pu être réduites en reproduisant un environnement 3D, en réalisant des cocultures et en développant des systèmes microfluidiques.

iii. Cultures cellulaires à deux et à trois dimensions (modèle 2D et modèle 3D)

La culture cellulaire en deux dimensions est la plus ancienne et la plus courante : les cellules adhèrent à une surface plane (par exemple une boîte de Pétri). La surface sert de support mécanique aux cellules et la répartition en monocouche permet aux cellules de profiter chacune de la même quantité optimale de nutriments et de facteurs de croissance. La prolifération cellulaire est ainsi homogène. Ces méthodes de culture sont adaptables à la robotisation et à l'automatisation. La plupart de ces méthodes 2D ne permettent néanmoins pas de contrôler la morphologie, la direction ou la forme des cellules (Tableau 2).

La culture cellulaire 2D traditionnelle peut être améliorée, notamment pour les cellules difficiles à cultiver comme les hépatocytes qui ne survivent pas bien dans ces conditions de culture basiques et dont la transcription des gènes en ARNm diminue lors de la mise en culture. Pour les hépatocytes, la méthode de culture en sandwich, c'est-à-dire en plaçant les cellules entre deux couches composées de matrice extracellulaire, permet de produire des cultures de cellules dont la morphologie et la fonction reproduisent plus précisément le comportement *in vivo*.

La culture cellulaire 2D traditionnelle (Figure 16) peut également être améliorée en réalisant la culture sur une membrane poreuse, constituant le fond d'un insert placé dans un puits de culture formant ainsi une chambre de culture à deux compartiments. Ce mode de culture est beaucoup utilisé pour les épithéliums respiratoires, intestinaux et cutanés car il permet d'améliorer la différenciation cellulaire.

Les cellules se polarisent et peuvent être gardées pour une plus longue période. Il est également envisageable de réaliser des cocultures, permettant de mettre en contact deux types cellulaires ou de les séparer de part et d'autre de la membrane poreuse. Dans ce dernier cas, ce support est conçu pour assurer un environnement de culture cellulaire plus proche de celui *in vivo*.

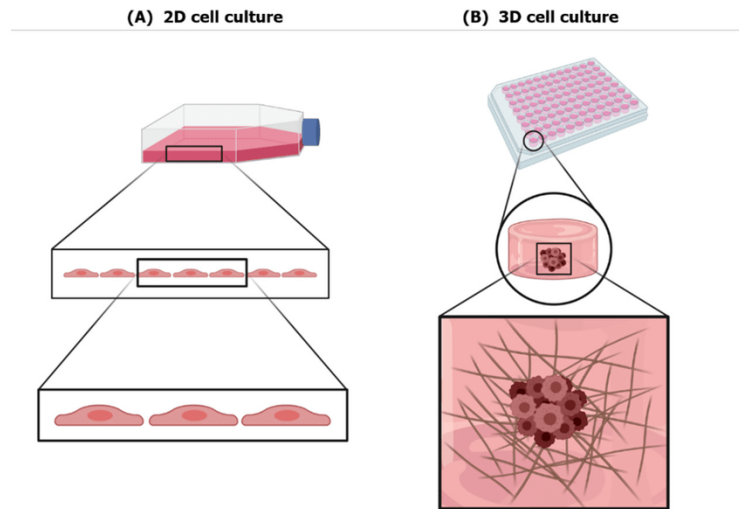


Figure 16 Différence schématique d'organisation entre les cultures cellulaires 2D et 3D (102)

La culture cellulaire en 3D (Figure 16) vise à modéliser les interactions *in vivo* des tissus afin d'étudier les signaux biochimiques et biomécaniques. Un micro-environnement bien conçu en génie tissulaire et cellulaire peut être utilisé pour favoriser la prolifération, la migration, la production de matrice et la différenciation des cellules souches.

Ces systèmes tridimensionnels peuvent être basés sur des supports (*scaffold*) différents : des réseaux macro et microporeux (à base de polymères ou de protéines de la matrice extracellulaire), des hydrogels (synthétiques ou naturels), ou encore des supports plastiques (inserts ou films microstructures).

Les sphéroïdes sont des agrégats de cellules qui adhèrent entre elles par l'intermédiaire de matrice extracellulaire et de connexions intercellulaires. Les sphéroïdes sont plus complexes que les cultures en 2D grâce aux interactions cellule-cellule et cellule-matrice. Ils permettent ainsi de mieux modéliser *in vitro* le micro-environnement des tissus *in vivo*.

Les sphéroïdes est l'un des moyens les plus courants et les plus polyvalents de cultiver des cellules en trois dimensions. Il existe plusieurs méthodes pour obtenir des sphéroïdes à partir de cellules tumorales ou bien de cellules primaires, entre autres :

- Microfluidique (Figure 17) : permet d'assurer un apport continu en oxygène et en facteurs de croissance durant la culture grâce à l'utilisation de matériaux perméables aux facteurs solubles (103). Les canaux microfluidiques sont utilisés pour favoriser la formation d'agrégats cellulaires. Cette méthode ouvre des possibilités pour la production continue de sphéroïdes hautement contrôlés.

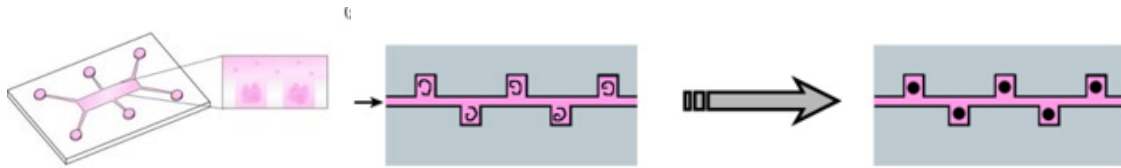


Figure 17 Schéma de sphéroïdes couplés à la technologie microfluidique

- Micropuces : des puits en PDMS (Figure 18) avec une ouverture en forme de pyramide sont formés pour favoriser la formation et la croissance des sphéroïdes ainsi que pour contrôler leur taille. Ces techniques sont regroupées sous le nom de sphéroïdes sur puce (*spheroids on a chip*) (104).

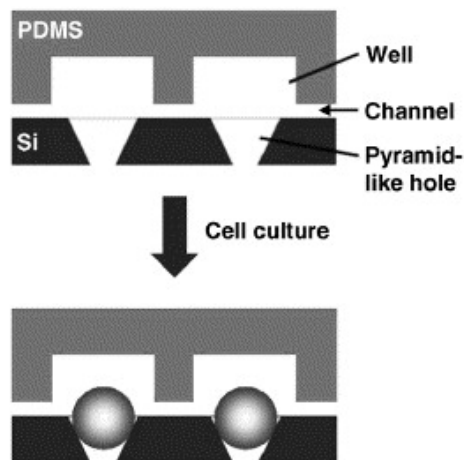


Figure 18 Schéma de sphéroïdes sur micropuces (*Spheroids on a chip*) (105)

- A partir de cellules pluripotentes (cellules souches embryonnaires ou cellules souches pluripotentes) : les cellules souches pluripotentes se transforment en sphéroïdes avec des structures luminales (Figure 19). Une telle auto-organisation récapitule les processus de l'embryogenèse précoce. Les agrégats de cellules souches pluripotentes induites forment des corps embryoïdes constitués de cellules externes, qui se différencient vers l'épithélium endodermique et déposent une membrane basale. Des cellules épiblastiques adjacentes se polarisent en un épithélium cylindrique (106).

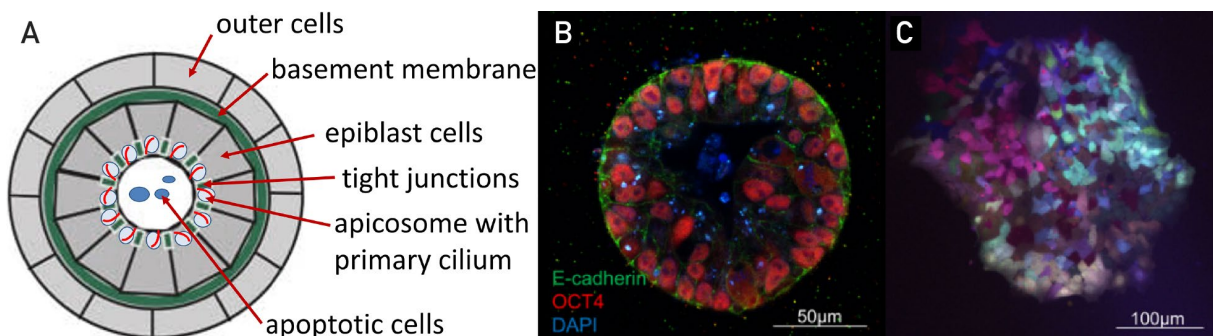


Figure 19 Schéma de corps embryoïdes

- A partir d'hydrogels de collagène (Figure 20 a) (107), de biofilms (Figure 20 b) ou de particules (Figure 20 c).

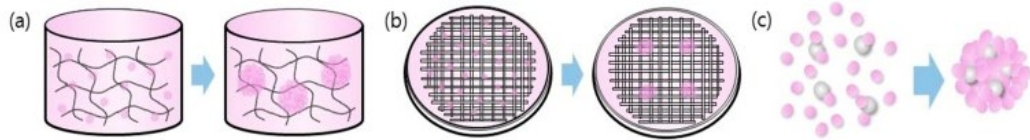


Figure 20 Schéma de sphéroïdes produits à partir d'une matrice

- L'agrégation en micropuits ou en « goutte pendante » (hanging drop) utilise la tension superficielle et la force gravitationnelle. Cette méthode consiste à former des agrégats en gouttes suspendues à une surface. De nouvelles plates-formes dans des formats de plaques de 96 et 384 puits permettent la formation d'agrégats plus petits, avec une taille plus contrôlée et sont moins exigeantes en main-d'œuvre (105,108–110).

Cependant, le manque d'uniformité dans le diamètre ou la morphologie des sphéroïdes apparaît comme un défi important pour améliorer la reproductibilité de la méthode.

Dans le contexte de la culture de cellules tumorales pour le criblage de médicaments, la co-culture de cellules normales et de cellules tumorales peut être utilisée pour reconstruire l'environnement multicellulaire hétérogène des tumeurs solides. La co-culture permet d'étudier les interactions entre les cellules tumorales et les environnements cellulaires périphériques. En outre, parce que les cellules hôtes normales proximales aux cellules tumorales peuvent influencer la sensibilité aux médicaments des cellules tumorales, des co-cultures sphéroïdes peuvent être utilisées lors de l'étape de screening.

Une autre approche consiste à créer plusieurs couches de cellules. C'est avec succès que la fonction pulsatile des cardiomyocytes, dans une construction 3D superposant de multiples feuilletts cellulaires a été reproduite. Cette approche a démontré que l'utilisation d'un *scaffold* synthétisé et biodégradable n'était pas nécessaire pour développer un tissu fonctionnant correctement (111).

Exemple de la cardiotoxicité : La cardiotoxicité est l'une des principales raisons de retraits de médicaments, représentant 45% de tous les médicaments retirés du marché entre 1994 et 2006. L'exclusion des molécules cardiotoxiques aux premières phases du développement du médicament est essentielle pour prévenir l'échec à un stade avancé du développement dudit médicament. Ces tests, très importants en précliniques, sont généralement réalisés sur des cardiomyocytes dérivés d'iPS en culture 3D. Le test d'inhibition du canal hERG est une mesure très sensible qui permet d'identifier les composés présentant une cardiotoxicité liée à l'inhibition du canal hERG *in vivo*. Tous les composés qui inhibent l'activité hERG *in vitro* ne provoqueront pas une cardiotoxicité *in vivo* mais le test donne une première information de toxicité probable. La pertinence des données *in vitro* dépendra aussi d'autres facteurs tels que les concentrations plasmatiques atteintes *in vivo*. Au niveau cellulaire, la repolarisation

cardiaque est un processus complexe permis par un équilibre fragile entre de multiples courants entrants et sortants (notamment des courants cardiaques potassiques I_K , calciques Ca^{2+} de type L I_{CaL} et sodique Na^+ I_{Na}). Au niveau du cœur, les différences de densités de courant au sein des ventricules sont responsables d'une hétérogénéité de la repolarisation ventriculaire. C'est cette hétérogénéité qui donne lieu au QT long.

Parmi les nouvelles technologies *in vitro*, les dispositifs d'organe sur puce (OoC) ont gagné un intérêt considérable au sein de la communauté scientifique. La façon dont cette technologie peut recréer la physiologie corporelle promet de révolutionner la science, y compris la recherche biomédicale, le développement de médicaments, la sécurité chimique et la médecine personnalisée. Néanmoins, un processus de qualification complet est nécessaire pour démontrer sa pertinence et encourager la mise en œuvre par les utilisateurs finaux et les organismes de réglementation. À cet égard, EURL ECVAM collabore activement avec l'*European Organ-on-Chip Society* (EUROoCS), qui provient en partie du projet ORCHID H2020.

Tableau 2 Comparatif entre les cultures cellulaires 2D et 3D

2D vs. 3D (Figure 21)	Cultures cellulaires 2D	Cultures cellulaires 3D
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> • Bien établi pour réaliser une évaluation primaire • Rapide (quelques minutes à quelques heures) • Économique • Reproductible • Facile et pratique à analyser • Capacité de débit élevée : réalisable pour le criblage de masse • Comparaison des résultats entre les analyses et les publications 	<ul style="list-style-type: none"> • Assez rapide (de quelques heures à quelques jours) • Les substrats imitent la matrice extra-cellulaire naturelle • Modélise le microenvironnement <i>in vivo</i>, ainsi que les interactions cellule-cellule et cellule-matrice • Permet de modéliser les barrières physiologiques (peau, poumon, hématoencéphalique et placentaire) • Permet d'évaluer la phase de pénétration tissulaire et la résistance des cellules aux médicaments. • Transposition <i>in vitro-in vivo</i> facile : coût global du test pré-clinique <i>in vivo</i> moindre • Expression des gènes, de l'ARN et de la biochimie identique à l'<i>in vivo</i>
Limites	<ul style="list-style-type: none"> • Substrat en plastique rigide • Manque d'informations sur les interactions cellule-cellule et cellule-matrice • Incapable d'imiter le microenvironnement <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Plus coûteux • Plus complexe à mettre en œuvre • Capacité de débit relativement faible <ul style="list-style-type: none"> ➤ Rendement plus faible

	<ul style="list-style-type: none"> • Distribution homogène des médicaments • Incapable d'évaluer la capacité de pénétration des tissus des cellules • Transposition <i>in vitro-in vivo</i> difficile : coût élevé • Changement de l'expression des gènes, de l'ARN et de la biochimie • Changement de la morphologie des cellules et de leur phénotype, perte de la polarité 	<ul style="list-style-type: none"> • Reproductibilité plus difficile donc pose un problème de fiabilité des résultats • Plus difficile à interpréter • Manque d'une approche standard
--	--	--

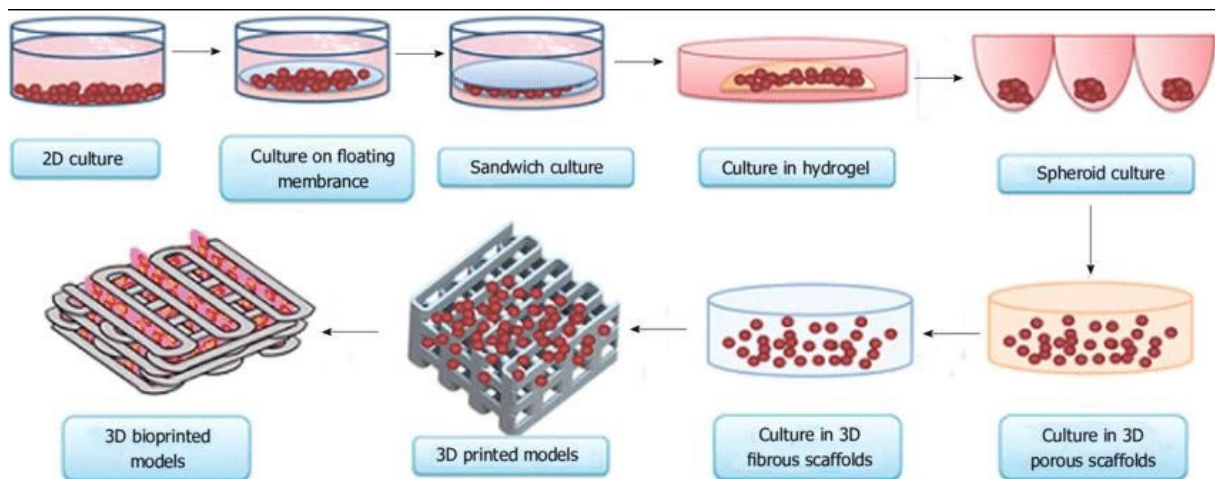


Figure 21 Synthèse des différentes techniques de cultures cellulaires abordées, par ordre de développement

iv. Organoïdes et organe-sur-puce

Les organoïdes sont une version miniaturisée des organes humains. En pratique, c'est un type de culture cellulaire en trois dimensions (3D) modélisant le tissu dont les cellules sont issues. L'organoïde est formé à partir d'une ou plusieurs cellule(s) souche(s) isolée(s) qui reproduisent une architecture complexe proche du tissu par leurs mécanismes de différenciations et d'auto-renouvellement. La caractéristique commune à tous les organoïdes est donc qu'ils sont créés à partir de cellules souches pluripotentes (CSP) ou de cellules souches adultes en imitant le développement humain ou régénération tissulaire *in vitro* (112).

Ce qui les rendent particulièrement intéressantes c'est que ces structures possèdent des caractéristiques physiques, cellulaires, moléculaires et génétiques similaires voire identiques à celles du tissu dont elle s'inspire *in vivo* grâce aux propriétés d'auto-organisation et d'auto-structurations des cellules souches (appelé self-patterning)(113).

On retrouve des exemples de modèles organoïdes prometteurs dans la modélisation de pathologies humaines à différents stades de la vie, du développement précoce à l'âge adulte.

En pratique, les connaissances de la biologie du développement sont appliquées à des cellules souches (ou induites) pour obtenir des types cellulaires différenciés à partir de ces cellules souches. Yoshiki Sasai et ses collègues ont été les premiers à aller plus loin en se demandant si un tel système *in vitro* pourrait reprendre certains des systèmes de régulation de l'organogenèse, non seulement en termes de différenciation cellulaire, mais également de structuration spatiale et de morphogenèse. Ils ont développé des méthodes pour générer des structures cérébrales, de la rétine et de l'hypophyse.

Exemple d'un organoïde de cerveau :

Ci-dessous, tiré de l'article « *Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells* » de Madeline A. Lancaster, on peut voir comment les connaissances du développement du cerveau chez l'embryon sont utilisées et appliquées pour recréer le processus à partir de cellules souches (114).

Lors du développement physiologique, le système nerveux central dérive de l'ectoderme neural. Mis en place d'abord comme plaque neurale, il est ensuite façonné dans le tube neural par pliage et fusion. Les gradients morphogènes dans ce tube établissent un axe dorso-ventral (toit, aire, basal et plaque de plancher) et un axe rostral-caudal (télencéphale, diencéphale, mésencéphale, rhombencéphale et moelle épinière). Les neurones sont généralement générés à partir de cellules souches neurales qui résident près des ventricules. Ces cellules souches augmentent initialement leur nombre par des divisions symétriques. Au cours de la neurogenèse, les cellules souches passent à des divisions asymétriques pour produire des ondes temporelles de progéniteurs auto-renouvelables distincts et de types cellulaires différenciés, tels que les neurones et les progéniteurs intermédiaires, qui migrent vers l'extérieur pour générer des structures stratifiées spécifiques à une région telles que la moelle, le tectum optique, et le cortex cérébral (Figure 22).

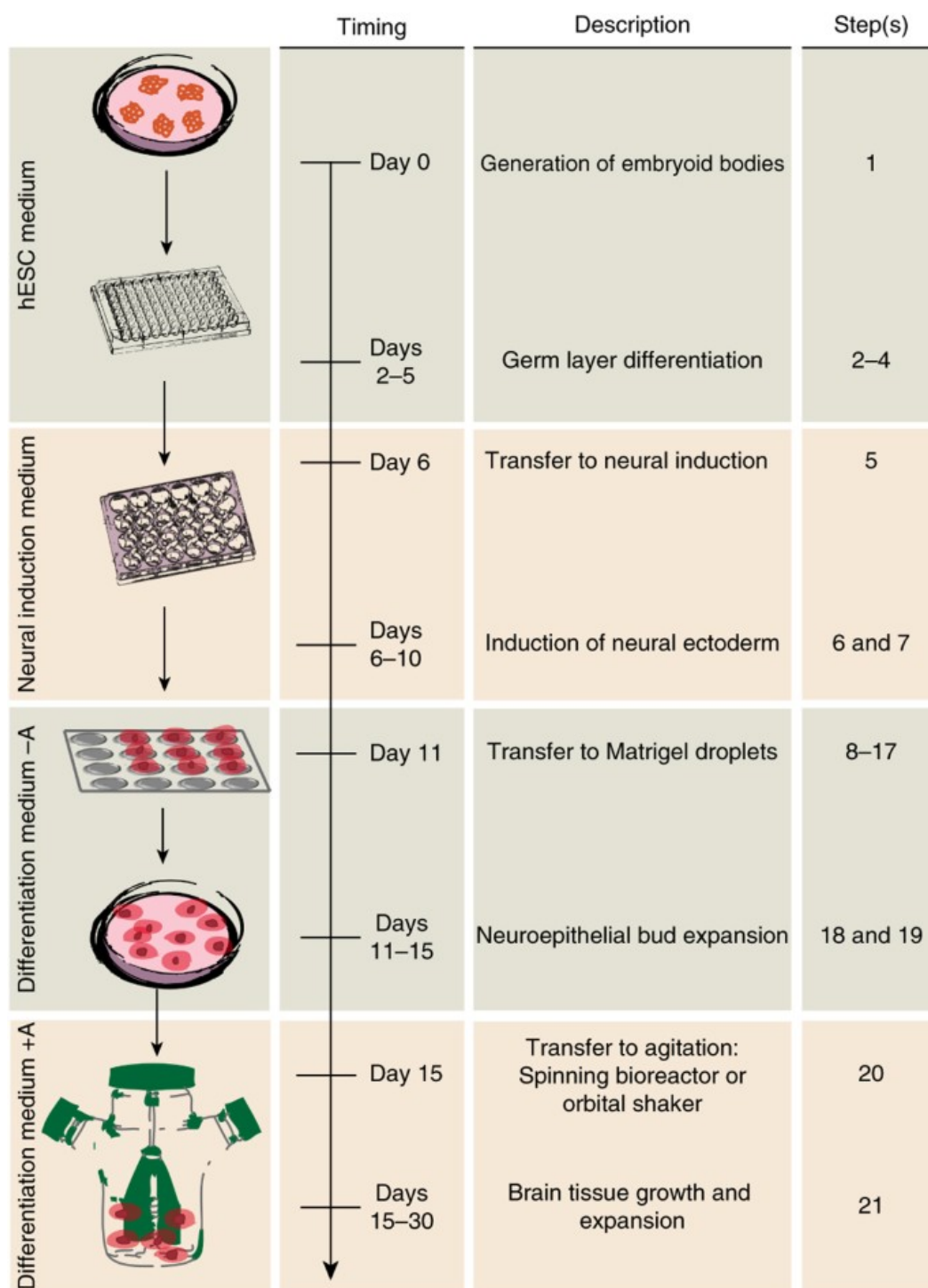


Figure 22 Etapes de développement d'un organoïde de cerveau

Pour le développement d'un organoïde, il convient d'avoir une attention particulière au microenvironnement cellulaire créé. Parmi les grandes avancées des essais *in vitro*, les nouvelles technologies de microfabrication de l'industrie des micropuces et des approches microfluidiques jouent un rôle crucial. Elles permettent de créer des microenvironnements de culture cellulaire qui soutiennent à la fois la différenciation tissulaire et modélisent les interfaces tissu-tissu, les gradients chimiques spatio-temporels et les microenvironnements mécaniques similaires aux organes *in vivo*. Les techniques de microfabrication, telles que la photolithographie (figure 23a), le moulage de

répliques et l'impression par microcontact (figure 23b) sont utilisées pour créer des structures avec des formes et des positions définies à l'échelle micrométrique et sont utilisées pour positionner les cellules et les tissus, contrôler la forme et le fonctionnement des cellules, et créer des microenvironnements de culture 3D structurés (115–117). La microfluidique est comme son nom l'indique la science des écoulements de petits volumes de fluides (10^{-9} à 10^{-18} litres). Pour cela des structures avec canaux creux microfabriqués sont réalisées (Figure 23c) pour réguler avec précision des écoulements de fluide dynamiques et des gradients spatio-temporels et donc permettre de fournir des nutriments et d'autres signaux chimiques aux cellules de manière contrôlée (118).

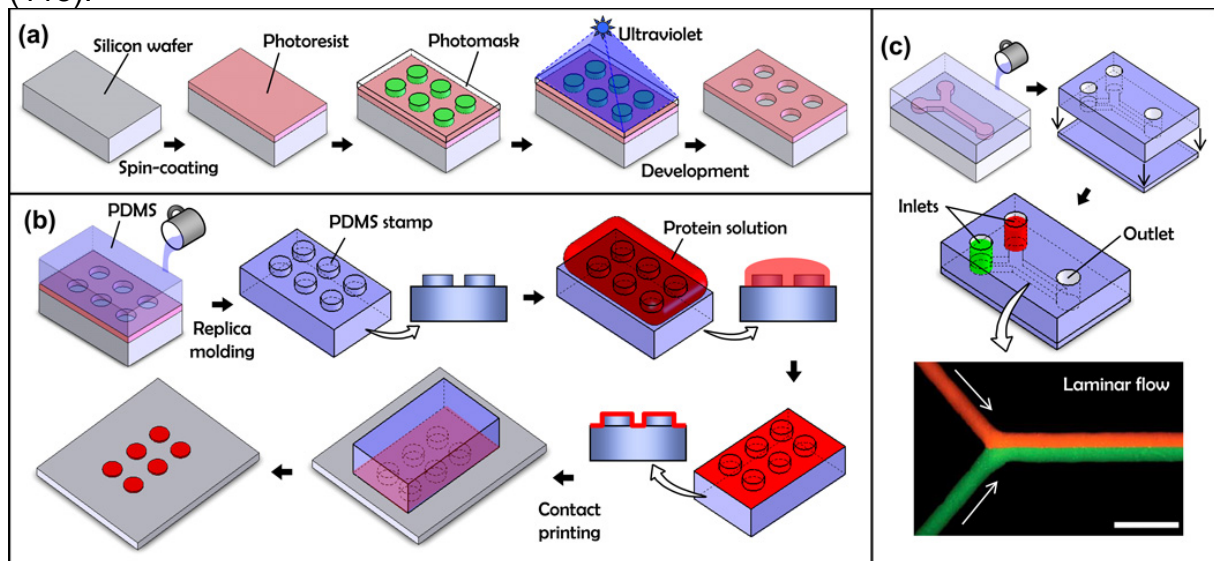


Figure 23 Techniques de microfabrications

(a) La photolithographie est une technique de micro-fabrication permettant de reproduire des motifs microscopiques sur des matériaux photosensibles par exposition à un rayonnement optique. Une plaquette de silicium est revêtu par centrifugation d'un film photosensible appelé photo-résine, qui est ensuite aligné et mis en contact étroit avec un photomasque (plaque de verre transparente recouverte d'un motif défini par des couches de chrome opaques) ; le motif souhaité est généré à l'aide d'un logiciel de conception assistée par ordinateur. Ceci est suivi par l'exposition de la photo-résine à une lumière ultraviolette (UV) de haute intensité à travers le photomasque, qui protège grâce à ses motifs. Les zones exposées aux UV deviennent solubles dans une solution de développement et se dissolvent laissant ainsi le motif à micro-échelle souhaité gravé dans la résine photosensible.

(b) La lithographie douce implique la fabrication de tampons en élastomère par moulage. Un précurseur liquide de PDMS est coulé contre un motif produit par photolithographie. Le substrat de PDMS est donc identique à l'empreinte d'origine. En impression microcontact, le tampon PDMS est encre avec une solution de protéine et mis en contact avec une surface pendant une période allant de 30 secondes à plusieurs minutes. Lors du retrait du tampon, un motif est généré sur la surface de la structure en bas-relief et recrée donc avec précision le motif.

(c) Les dispositifs microfluidiques sont généralement réalisés en collant un substrat PDMS dans lequel des microcanaux ont été créés par moulage de réplique avec une dalle PDMS vierge. Dans ces microdispositifs, deux fluides (rouge et vert), chacun venant d'une extrémité différente, se rencontrent à une jonction en Y et pénètrent dans un microcanal droit dans lequel ils s'écoulent dans des flux laminaires adjacents sans se mélanger.

Des dispositifs microfluidiques plus complexes peuvent être réalisés pour une meilleure maîtrise des microenvironnements contrôlés pour la culture et la différenciation à long terme de divers types de cellules.

Dans son article « *A Microfabricated Array Bioreactor for Perfused 3D Liver Culture* », Mark J Powers a par exemple développé un dispositif microfluidique contenant un bioréacteur à flux croisés composé de deux réseaux parallèles de microcanaux en silicium et en acier inoxydable séparés par une fine membrane perméable pour étudier les exigences métaboliques des hépatocytes primaires de rat (Figure 24) (119).

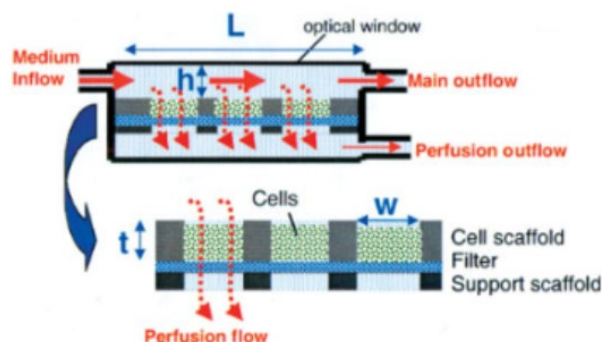


Figure 24 Dispositif microfluidique pour la culture 3D d'hépatocytes

L'apport efficace d'oxygène et le maintien des niveaux physiologiques de contraintes de cisaillement du fluide dans le microréacteur ont permis aux cellules hépatiques de se réorganiser en structures 3D ressemblant à des tissus qui sont restées viables jusqu'à 3 semaines de culture.

La production de ces premiers microsystèmes était initialement réalisée par des techniques de microfabrication et de micro-usinage du silicium mais ont été remplacées par des systèmes microfluidiques à base de caoutchouc de silicone, le poly(diméthylsiloxane) (PDMS), moins coûteux et plus faciles à fabriquer. Le PDMS ne se corrode pas et n'est pas affecté par les solutions aqueuses utilisées en culture cellulaire, ni par la pression ou la température, ce qui permet aux cellules de survivre ou de se développer.

Le PDMS a une perméabilité aux gaz élevée qui assure un apport suffisant en oxygène aux cellules par des microcanaux, éliminant ainsi le besoin d'oxygénateurs séparés qui sont couramment requis dans les dispositifs en silicium, en verre et en plastique. Cet apport améliore le maintien de la fonction différenciée des cellules primaires avec des exigences métaboliques élevées, telles que les cellules épithéliales hépatiques (120), épithéliales rénales (121), de kératinocytes épidermiques (122), d'ostéoblastes (123,124) ou encore de chondrocytes (125).

Un autre avantage du PDMS est sa transparence optique car elle permet d'effectuer des mesures en temps réel (par exemple les changements de résistance vasculaire pulmonaire ou la surveillance de la réorganisation des tissus).

De plus, la grande flexibilité du PDMS permet un contrôle automatisé précis du flux de fluide dans les canaux créés tout en permettant de reproduire les cisaillements des fluides physiologiques et l'écoulement pulsatile (par exemple pour l'analyse des

réponses des cellules endothéliales vasculaires humaines aux stress hémodynamiques).

Des motifs et des structures sont microfabriqués par moulage ou gaufrage dans le PDMS pour recréer le plus fidèlement possible les conditions physiologiques. Enfin, grâce aux techniques de microfabrication, des sondes électriques, chimiques, mécaniques et optiques pour la visualisation directe et l'analyse quantitative de la biochimie cellulaire, de l'expression génique, de la structure et des réponses mécaniques peuvent également être intégrées dans pratiquement n'importe quel dispositif de culture cellulaire.

Les organ-on-chip (ou organe sur puce) sont des dispositifs dérivant de cette technologie microfluidique : c'est une puce de culture composée de PDMS transparent et flexible de quelques centimètres (Figure 25), qui contient deux canaux creux parallèles séparés par une membrane poreuse.

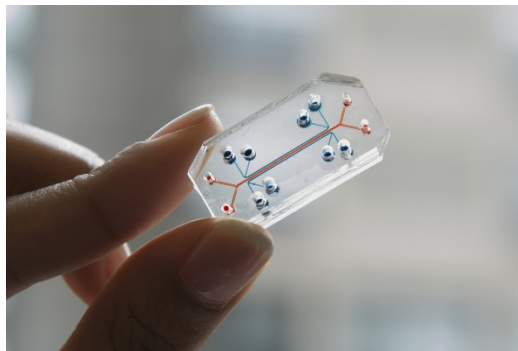


Figure 25 Photographie d'un dispositif d'organe sur puce

Des cellules spécifiques d'organes sont cultivées d'un côté de la membrane dans l'un des canaux. Des cellules endothéliales vasculaires modélisant un vaisseau sanguin s'alignent de l'autre côté de la membrane, tandis que chaque canal est indépendamment perfusé avec un milieu spécifique du type cellulaire. La membrane poreuse permet aux deux compartiments de communiquer entre eux et d'échanger des molécules telles que des cytokines, des facteurs de croissance et des médicaments, ainsi que des produits de dégradation des médicaments générés par des activités métaboliques spécifiques à un organe.

Donald Ingber, et son équipe du Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering de Harvard, ont pour projet de développer le premier modèle humain « Organ-on-a-Chip » pour modéliser la physiologie et la physiopathologie avec une grande fidélité.

Son idée est de mettre en série et en parallèles différents types d'organes sur puce en transférant des fluides entre les canaux vasculaires pour imiter le flux sanguin. Un tel système permettrait d'évaluer les comportements pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des médicaments dans l'ensemble du système.

Le défi lancé par le laboratoire est de développer 10 types de puces d'organes qui récapitulent les fonctionnalités complexes de 10 organes humains différents, le tout relié par un instrument automatisé pour la perfusion fluide des cellules (Figure 26) (126).

Dans un premier article, l'équipe Wyss présente une plate-forme Body-on-Chips modulaire activée par un instrument appelé "Interrogator". Cet outil permet de cultiver, de

perfuser et de lier de nombreux tissus humains vivants cultivés dans un système de puces multi-organes, d'échantillonner le milieu de manière entièrement programmable en utilisant les capacités de transfert de liquide robotique de l'appareil, tout en continuant de surveiller l'intégrité des tissus avec un microscope intégré.

Dans un second article, une méthode de mise à l'échelle informatique est mise au point pour transposer les données obtenues à partir d'expériences impliquant 3 types différents de puces d'organes liées par voie fluide aux dimensions d'organes respectives *in vivo*. L'approche est capable de prédire quantitativement précisément les changements de concentration des médicaments au fil du temps, ainsi que les toxicités spécifiques aux organes par comparaison à ce qui est mesuré en clinique (127).

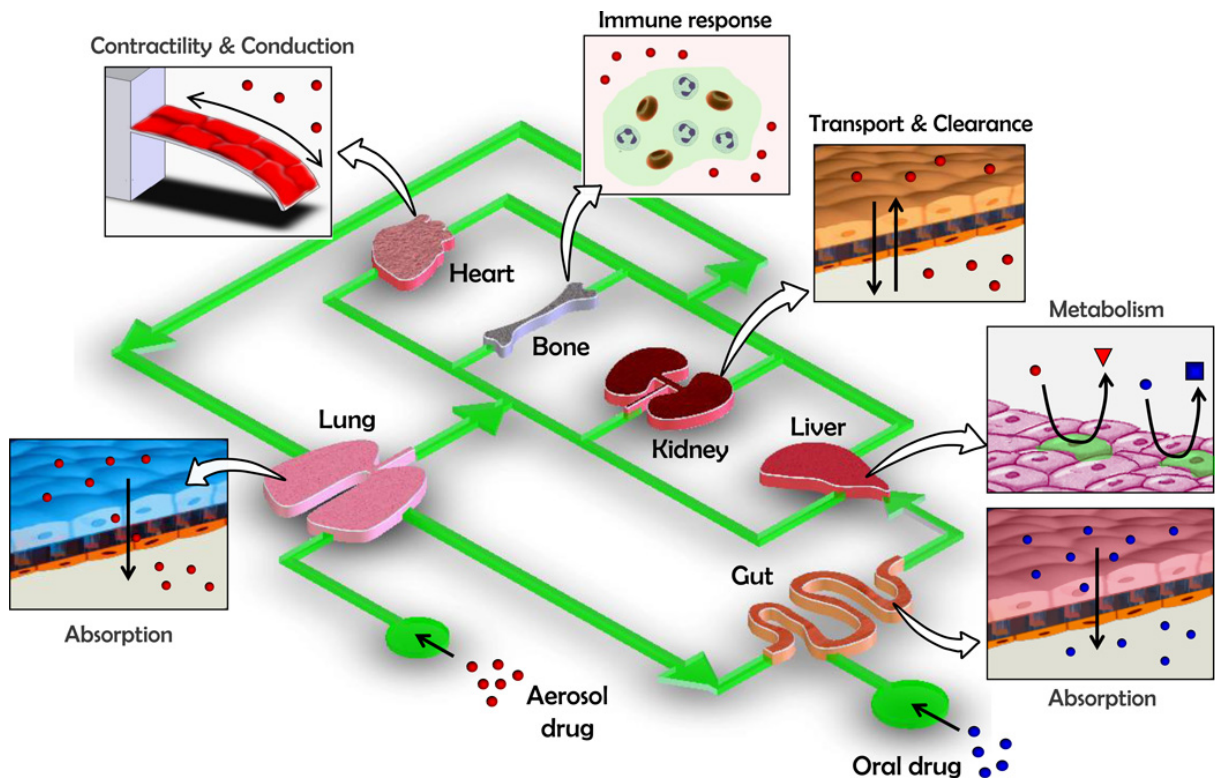


Figure 26 Schéma du Body-on-chip de l'Institut Wyss

b. Omics, biopuces et exposome

Les « omics », ou « omiques » en français pour analyse omiques est un terme recouvrant beaucoup de techniques différentes : ce sont les techniques d'analyse à grande échelle de molécules biologiques. Par exemple, l'étude du génome (ensemble des gènes) est appelée génomique (Figure 27). L'idée qui en découle est qu'un événement physiologique (ou induit par un xénobiotique) va modifier la composition et l'activité des cellules et que ces modifications peuvent être détectées à différents niveaux cellulaires. Ces techniques nécessitent donc une connaissance spécialisée selon la nature de ce qui est étudié. En toxicologie, ces méthodes ont pour objectif de donner des résultats plus précoces lorsqu'elles sont utilisées comme outils prédictifs et plus précis en tant qu'outils mécanistiques.

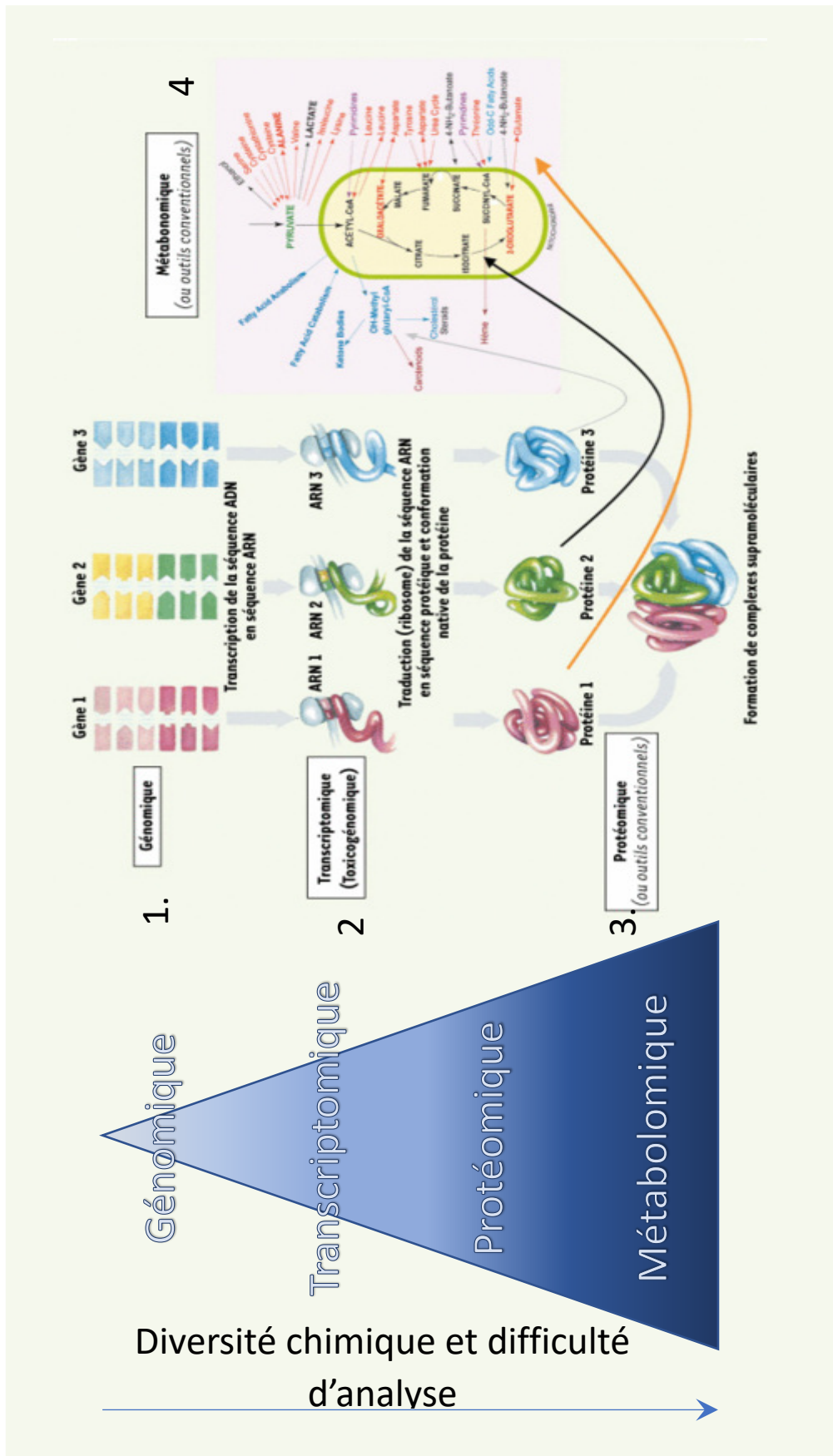


Figure 27 Différentes catégories des omiques

(Figure 27) 1. La génomique est utilisée pour l'analyse de différents allèles et le typage de certaines populations dans les essais thérapeutiques mais reste peu utilisée en toxicologie.

(Figure 27) 2. La transcriptomique ou Toxicogénomique est inversement très utilisée en toxicologie, elle étudie les surexpressions ou les répressions des ARNm après l'action d'un xénobiotique.

De plus en plus souvent, les génomes et les transcriptomes sont analysés par des techniques de séquençage profond (*ultra-deep sequencing*) (128), qui rendent possible une analyse exhaustive et sans saturation. Cette dernière peut détecter des mutations à basse fréquence et fournir des informations substantielles sur la structure de la population, c'est-à-dire l'ensemble des différentes variantes et leurs fréquences relatives (129).

(Figure 27) 3. La protéomique, elle est utilisée pour étudier les phénomènes de régulation post-transcriptionnels.

(Figure 27) 4. La métabolomique, c'est l'étude des réponses à l'échelle de la cellule et des organites et met en évidence des modifications de phénotype métabolique. Il s'agit de mesurer la réponse finale de l'organisme *via* l'analyse globale des molécules de faible poids moléculaire (acides aminés, sucres, lipides...). En raison de la variété chimique des molécules détectées, différentes techniques sont associées telles que RMN (résonance magnétique nucléaire) ou spectrométrie de masse.

N'étant pas amplifiables par des techniques de type PCR, les protéomes et les métabolomes sont analysés par des techniques basées sur la spectrométrie de masse (Figure 28)(130).

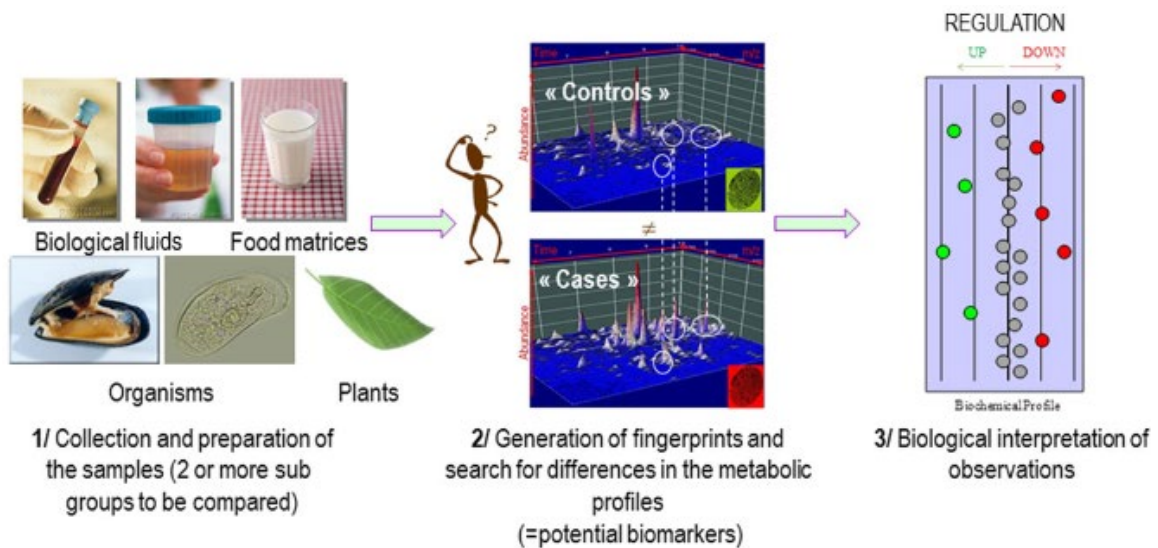


Figure 28 Spectrométrie appliquée à la métabolomique (131)

Malgré la très grande sensibilité de ces analyses, la complexité de la protéomique et de la métabolomique est telle qu'une analyse exhaustive n'est pas possible et réaliser un sous-échantillonnage est nécessaire pour obtenir des analyses *a priori* pertinentes.

Les « omics » sont donc généralement utilisés dans les étapes précoces de développement, donnant une compréhension des mécanismes de toxicité. Il est largement considéré que les toxiques agissant par le même mécanisme d'action entraînent des profils de dérégulation génique ou métabolomique similaires, cela permet de prédire lors d'essais à court terme les effets à long terme d'une substance médicamenteuse. On parle de profil toxique. Ce type d'analyse nécessite donc des bases de données suffisamment complètes pour être prédictives. Des listes de gènes ou de métabolites potentiellement prédictifs d'hépatotoxicité, de néphrotoxicité ou de carcinogénicité ont par exemple été établies.

c. Les méthodes “*in silico*”¹⁴

L'augmentation rapide de la puissance de calculs des ordinateurs a permis l'utilisation d'algorithmes de simulation numérique de plus en plus complexes.

Leur objectif est la prédiction quantitative et/ou qualitative la plus précise possible du comportement de systèmes biologiques complexes à partir de données issues d'expériences empiriques et d'expérimentations simulées. Les bases de données des résultats issus d'approches empiriques permettent d'améliorer la pertinence des algorithmes. De plus, les méthodes *in silico* permettent la simulation d'expérimentations qui auraient été très coûteuses et/ou éthiquement controversées (132).

i. La notion d'AOP (Adverse Outcome Pathway) :

Ce concept relie un effet adverse (ou délétère) avec un événement moléculaire initiateur c'est-à-dire l'interaction entre une substance chimique et une molécule du système biologique. C'est une vision mécanistique qui est reconnue par l'OCDE (133).

Les données et les connaissances accumulées à différents niveaux (subcellulaire, cellulaire, tissulaire, etc.) sont rassemblées et intégrées de façon à évaluer la toxicité. Les informations peuvent être obtenues grâce à des méthodes *in vitro*, *in vivo*, ou *in silico* (comme les modèles QSAR).

Cette approche permet aussi d'identifier les principales sources d'incertitude et les principales priorités de recherche pour répondre aux exigences réglementaires. Les AOP ne décrivent pas de manière exhaustive chaque interaction moléculaire d'un processus biologiques mais une suite d'états d'un système biologique avec quelques informations sur la transition entre ces états (133).

Un AOP est donc un outil pour faire un lien mécanistique entre une interaction moléculaire précise (par exemple la liaison covalente d'une substance avec l'ADN) et un effet délétère (par exemple la mutagenèse).

En pratique ces schémas conceptuels fournissent des informations sur les liens de causalité entre un événement initiateur moléculaire (MIE pour molecular initiating event), un événement clé intermédiaire (KEs pour key events) et un résultat indésirable

¹⁴ Néologisme par analogies à « *in vitro* » et « *in vivo* » est une référence au silicium, élément chimique indispensable à la construction des processeurs.

préoccupant sur le plan réglementaire, et permettent d'obtenir le contexte biologique. (Figure 29)

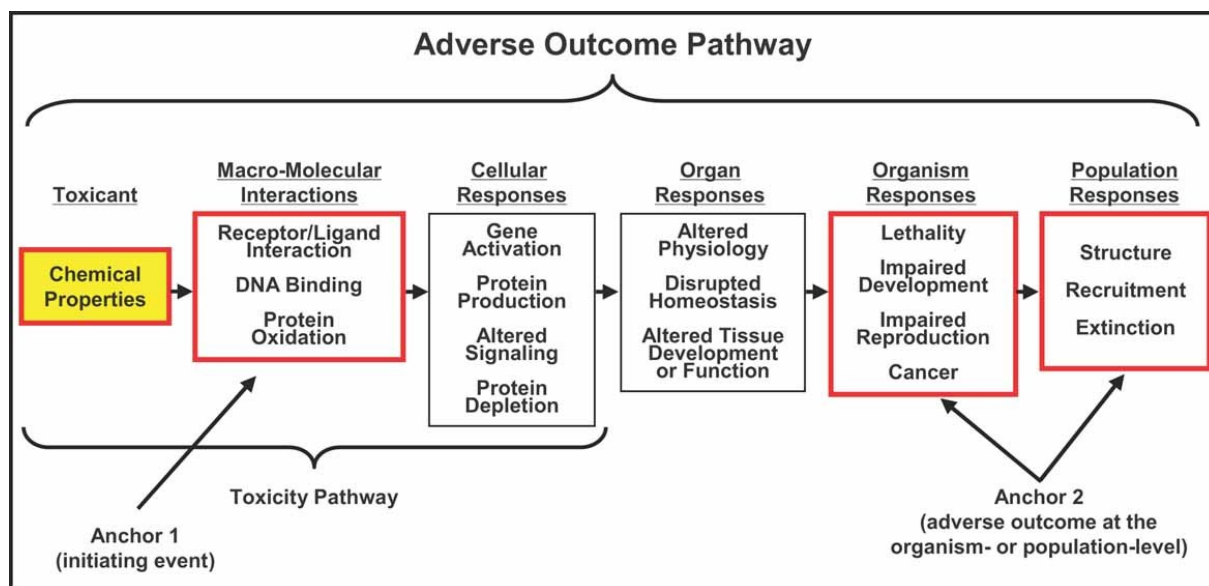


Figure 29 Construction d'un AOP

Les AOP ne sont pas spécifiques d'une substance médicamenteuse et sont donc extrapolables : ils décrivent les aspects toxicodynamiques et non pas les aspects toxicocinétiques.

D'un point de vue pratique, les AOP peuvent guider le développement de nouveaux tests *in vitro* censés reproduire un mécanisme toxicologique spécifique. Par exemple, la qualification *in vitro* ou *in silico* d'une étape clé se trouvant à l'intersection de plusieurs AOP serait d'une importance primordiale au sein d'une stratégie de criblage (133).

Plusieurs centaines d'exemples d'AOP peuvent être visualisés et étudiés grâce à l'initiative AOPWiki. Un exemple d'AOP est en Annexe 5. Ce répertoire en ligne représente l'archive de tous les AOP développées et en cours de développement dans le cadre des initiatives de l'OCDE.

Enfin, il faut aussi observer que les AOP se situent également à l'interface entre toxicologie et épidémiologie car ils peuvent fournir des éléments de preuve pour corroborer ou invalider des associations statistiques entre exposition aux substances médicamenteuses et effets néfastes.

ii. L'intégration des méthode *in silico* dans le développement du futur médicament :

La première étape du développement, la recherche fondamentale, permet d'identifier les potentielles cibles thérapeutiques associées à une pathologie donnée. Chacune de ces cibles passent une série de tests biologiques pour déterminer quelles substances peuvent être capables d'agir sur la cible (en l'activant ou en l'inhibant). Par la technique de criblage (screening en anglais) on identifie ensuite les molécules actives sur la cible d'intérêt (ou « hit »). C'est une étape d'orientation qui permet aussi par exemple de rechercher un potentiel génotoxique.

La connaissance de ces hits permet de rechercher des molécules analogues chimiquement en recherchant les substances prometteuses en termes d'efficacité et surtout de sécurité patient.

Cette partie repose sur le concept de « drug-likeness » : il s'agit du potentiel d'une substance à devenir un médicament notamment par l'évaluation du processus d'ADME et de la toxicité. (134,135) On a ainsi une première idée de l'innocuité chez l'Homme en vue des essais cliniques de phase I.

Cette étape donne aussi une première compréhension de la relation structure-activité (RSA) et donc d'orienter les modifications de structure pour optimiser les propriétés voulues : améliorer l'efficacité et la sélectivité par exemple. Ceci est accompli en modifiant itérativement la structure et en mesurant les propriétés du nouveau composé.

On étudie pour créer ce modèle différentes propriétés pour créer une « carte d'identité » la plus complète du hit d'après sa structure et ses propriétés physicochimiques, pharmacocinétique, biochimique et sa toxicité :

- Sa lipophilie et sa solubilité
- Son poids moléculaire (PM)
- Sa perméabilité
- La création de liaisons hydrogènes
- Les enzymes qui le métaboliseront
- Les transporteurs qu'il utilisera, s'il y en a.

En parallèle, cela permet d'établir une compréhension des mécanismes de la pharmacocinétique et pharmacodynamique et de construire un premier modèle prospectif :

- Une modélisation pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD) (Figure 30) : ensemble de modèles mathématiques prédisant l'évolution dans le temps de l'intensité de l'effet en réponse à l'administration d'une dose du futur médicament.
- Une modélisation physiologique pharmacocinétique (PBPK) (Figure 31) : modèle mathématique prédisant les étapes ADME. Ce modèle est déjà très utilisé dans l'industrie

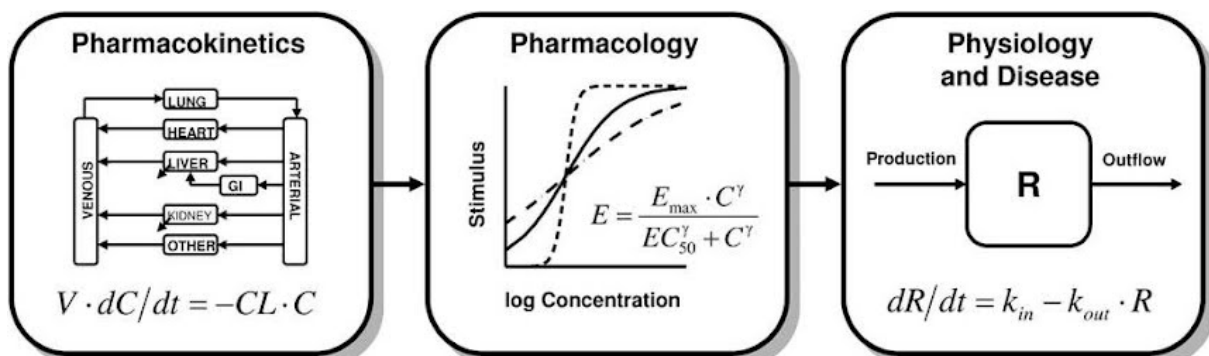


Figure 30 Schéma d'un modèle pharmacocinétique / pharmacodynamique : « PK/PD models »

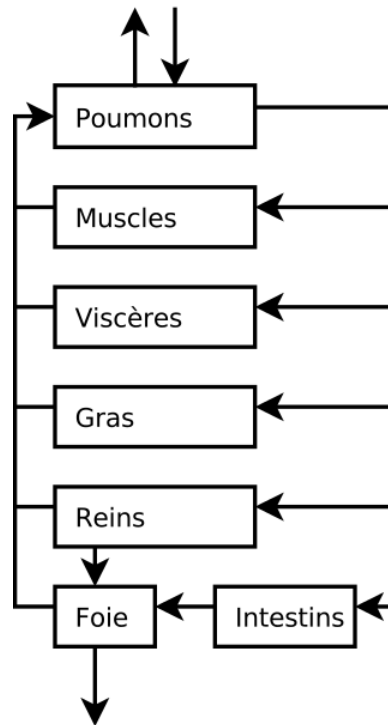


Figure 31 Schéma d'un modèle pharmacocinétique physiologique : « PBPK model »

Grâce à ces modèles mobilisant des expertises interdisciplinaires, on recherche l'optimisation des candidats-médicaments selon une balance entre efficacité, sélectivité, pharmacocinétique et innocuité.

L'optimisation de la pharmacocinétique jouera un rôle essentiel, notamment pour passer la phase clinique 2, théorisée sous le nom des « trois piliers de survie » des candidats médicaments (136) :

1. L'exposition de la substance au site d'action cible pendant une durée souhaitée (probabilité que la molécule rencontre la cible)
2. La liaison à la cible pharmacologique de la manière attendue pour son mode d'action (probabilité que la molécule s'accroche à la cible sachant qu'elle l'a rencontrée)
3. L'expression de l'activité pharmacologique de la molécule, elle-même fonction de l'exposition et de la liaison de la molécule à la cible.

Les modèles *in silico* étudient la toxicité par modélisation des mécanismes chimiques en se basant sur la connaissance des relations entre la structure et les propriétés des substances actives. Ces méthodes sont appelées SAR (pour *Structure-Activity Relationships*) ou (Q)SAR pour (*Quantitative Structure-Activity Relations*). Les connaissances utilisées par ces modèles nécessitent donc des bases de données les plus complètes possibles (132) à partir d'études *in vivo*, *in vitro* et de données cliniques. Toutes les données collectées sont reliées par des corrélations statistiques à la structure chimique des molécules.

Pour prédire l'activité biologique de composés non testés, on calculera par exemple le coefficient de partition polaire/apolaire ou protique/aprotique (par exemple eau/octanol) et le lien avec l'activité biologique.

Les variables utilisées pour caractériser les molécules sont appelées descripteurs moléculaires : plus de 5000 descripteurs différents peuvent être utilisés comme les effets stériques, les propriétés électroniques (énergies orbitales moléculaires par exemple) ou encore le nombre de doubles liaisons carbone-carbone et toutes les propriétés physicochimiques. (137)

On peut tester ces descripteurs pour l'optimisation du hit selon différents substituants. Le modèle QSAR est alors du type : $\log A = f(B) + f(C) + f(D) + \dots$ (Figure 32) en supposant les propriétés de la molécule indépendantes les unes des autres et ayant chacune un impact direct sur la quantification de l'activité et sur la probabilité d'interaction avec la cible.

- Avec A l'activité biologique de la molécule étudiée
- B le coefficient de partition eau/octanol
- C les effets stériques
- D les propriétés électroniques

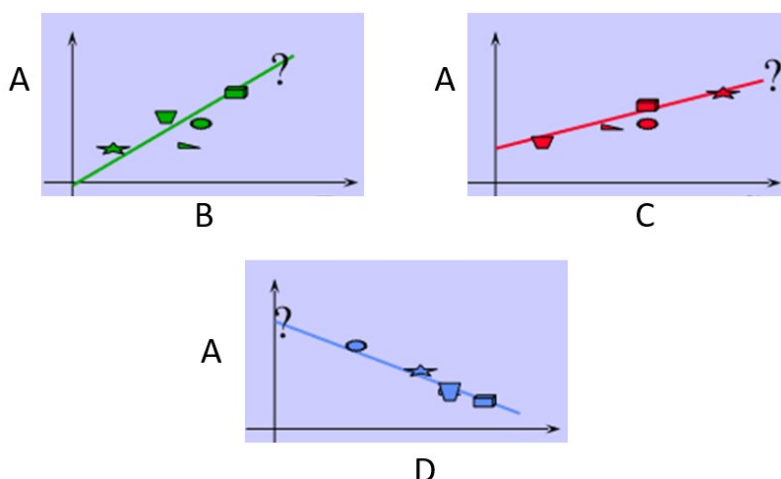


Figure 32 Schématisation du modèle QSAR

Chaque modèle QSAR est donc constitué de trois éléments :

- La liste des paramètres physicochimiques étudiés (B, C, D etc)
- L'effet toxicologique ou biologique recherché (A)
- Et un algorithme qui permet à travers des modèles mathématiques de quantifier l'impact d'un changement de la structure ($\log A = f(B) + f(C) + f(D) + \dots$)

Les limites de ce type de modèle QSAR sont :

- 1) Il ne prend pas en compte l'interdépendance des descripteurs

Différentes méthodes permettent d'augmenter la fiabilité du modèle : l'analyse en composantes principales (méthode statistique de détermination des descripteurs les plus discriminants), la régression des moindres carrés partiels (minimisation des variances des descripteurs), le regroupement hiérarchique (ou *Hierarchical clustering* est un système de classification automatique d'analyse des données) ou encore l'utilisation de réseaux neuronaux (systèmes de décisions automatisés capable d'apprentissage permettant ici de répondre à des problèmes biologiques, souvent statistique, en évaluant l'objet -ici la molécule-).

Par exemple, l'intelligence artificielle AlphaFold de DeepMind (filiale de Google) a utilisé la méthode de réseaux neuronaux pour réaliser un QSAR 3D et éclaircir un mystère de la biologie : la prédiction des structures 3D des protéines à partir de leur séquence d'acides aminés.(138)

Les algorithmes « apprennent » à évaluer et classifier les médicaments potentiels grâce à une base de données d'informations disponibles appelées set d'apprentissage ou de calibration, puis l'apprentissage est « vérifié » par un set de test : l'algorithme est confronté à une nouvelle base de données qu'il n'a pas apprise mais dont on connaît les caractéristiques. On confronte donc le réseau à une nouvelle situation et on vérifie que les résultats sont tout de même cohérents, si c'est le cas on peut espérer que le réseau sera performant.

- 2) Il modélise mal les interactions pour lesquelles l'activité biologique est dépendante de l'organisation dans l'espace des groupements chimiques

Pour pallier cette seconde limite, des modèles QSAR-3D sont développés : ils prennent en compte la structure 3D et les énergies d'interactions (par exemple, AlphaFold comme vu précédemment). Ces modèles permettent notamment de modéliser le pharmacophore (représentation 3D de la partie pharmacologiquement active de la molécule) (Figure 33).

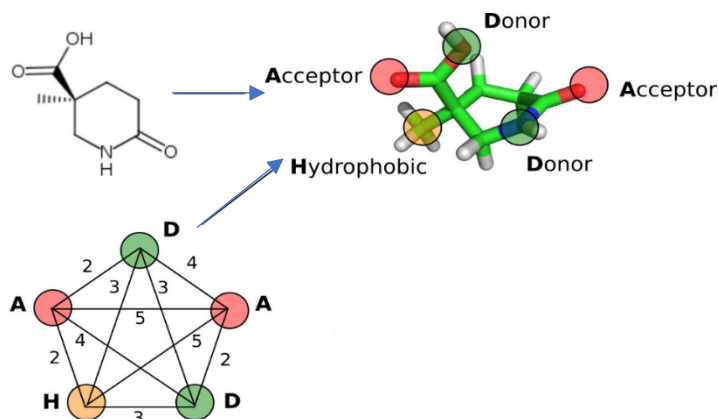


Figure 33 Modèle de QSAR 3D

La modélisation du pharmacophore permet de rechercher les composés avec un fort indice de similarité.

- 3) Il faut déterminer la conformation de la molécule pour laquelle le modèle est utilisé : lorsque la molécule est flexible ou lorsque les différentes conformations jouent un rôle dans la pharmacocinétique, les valeurs thermodynamiques correspondantes varieront (par exemple l'évaluation de l'énergie libre ou de l'entropie). Il faut donc adapter le modèle lorsque la géométrie 3D de la molécule peut se modifier.

Plusieurs modèles *in silico* ont été validés, c'est le cas par exemple de DEREK. Il permet d'étudier plusieurs types de toxicité : la mutagénèse, la cancérogénèse mais il est

surtout réputé pour sa prédiction de la sensibilisation cutanée. Il est régulièrement utilisé par l'industrie chimique.

La base de données utilisée est ainsi constamment enrichie par les utilisateurs, ce qui permet d'améliorer progressivement la prédictivité du modèle.

L'utilisation est très ergonomique :

- La structure de la substance pharmaceutique à étudier est saisie par un logiciel de dessin,
- Le programme applique les lois de relation structure-activité (RSA) et les données toxicologiques contenues dans sa base de données.
- Le système prédit l'activité et les éventuelles toxicités de la substance pharmaceutique

Le logiciel informe de plus l'utilisateur sur quels éléments se base sa prédiction : références bibliographiques, données de toxicité...

Ceci permet à l'utilisateur de savoir dans quelle mesure il est en accord avec les prédictions, d'envisager des modifications de structure afin d'obtenir une substance active moins toxique, et de conduire une étude bibliographique plus poussée si nécessaire. Ces modèles *in silico* ont évidemment des limites : pour la génotoxicité, leur prédictivité n'est pas totale (on retrouve une concordance de 65,6 % à 88 %), mais la combinaison de plusieurs modèles (par exemple DEREK, MCASE et Awork) permet d'augmenter la concordance (98,7 %).(139)

Concernant le potentiel de toxicité chronique, le potentiel cancérigène ou la toxicité sur le processus de la reproduction, la prédictivité est limitée car ces effets délétères résultent d'une multitude de variables, elles-mêmes influencées par divers mécanismes. Néanmoins, pour l'industrie pharmaceutique qui utilise une quantité très importante de substances actives, cette approche devient incontournable dans le domaine du *screening* des futurs médicaments, mais également dans l'évaluation de la toxicité des matières premières et des intermédiaires de synthèse pour assurer la sécurité au poste de travail de ses employés.

Les modèles QSAR peuvent entrer en jeu à chaque étape d'un AOP pour se substituer à des données *in vitro* ou *in vivo*. Par exemple, les effets de sensibilisation cutanée et génotoxiques peuvent être déclenchés par la formation de liaisons covalentes entre substances chimiques et protéines du derme ou, dans le cas de la génotoxicité, par la formation de liaisons covalentes entre substances chimiques et ADN.

En parallèle à ces données historiques, les nouvelles initiatives de criblage *in vitro* à haut débit comme le programme ToxCast (140) mettent à disposition des données relatives à la perturbation chimique de l'homéostasie cellulaire.

Ces données ont été obtenues en fonction de plusieurs centaines d'essais *in vitro* à haut débit et elles ouvrent des nouvelles perspectives pour la modélisation QSAR.

En effet, d'un point de vue pratique, la modélisation QSAR donne la possibilité d'attribuer rapidement des substances à toxicité inconnue à des AOP spécifiques et de cibler les investigations toxicologiques de façon raisonnée et planifiée comme au sein d'une approche d'évaluation du danger chimique basée sur l'intégration de différentes sources d'informations toxicologiques (approches IATA) (141).

A l'heure actuelle de nombreux modèles *in silico* sont basés sur des modèles de compartiments qui imitent l'évolution temporelle d'un composé (pharmacocinétique ou PK) et son effet sur l'organisme (pharmacodynamique ou PD). Les compartiments peuvent être fonctionnels (Figure 34) ou, dans une certaine mesure, spatiaux sans modéliser chaque cellule de manière individuelle. (142)

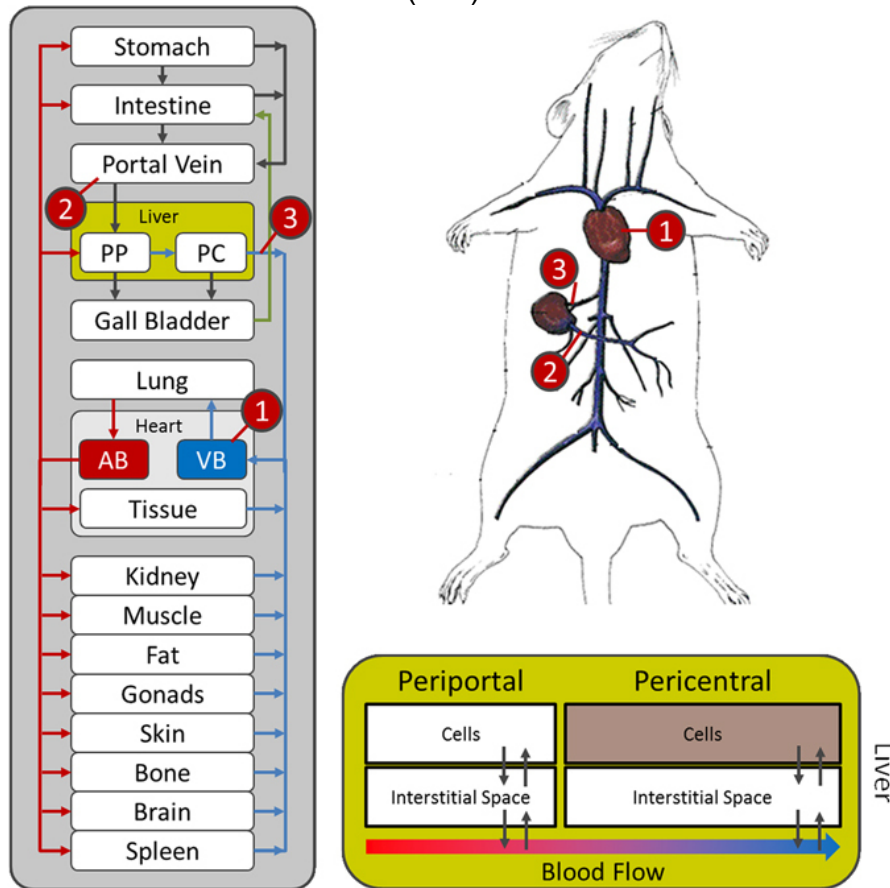


Figure 34 Modélisation PBPK chez la souris (143)

Les modèles d'équations différentielles partielles (EDP), qui tiennent compte à la fois de l'évolution dans le temps et du changement spatial d'un champ tel qu'une concentration locale, peuvent prendre en compte les effets spatiaux sur plusieurs diamètres cellulaires. Les quantités sont alors par construction des moyennes locales, généralement effectuées sur plusieurs diamètres cellulaires. Chaque cellule individuelle au sein de modèles à base d'agents peut être considérée comme un compartiment spatial capable de se déplacer, de croître, de se diviser et de mourir. Le mouvement des cellules dans de tels modèles est calculé à l'aide d'une équation de mouvement, qui fait apparaître les forces exercées sur chaque cellule (144). L'équation associée permet de calculer le mouvement d'une cellule à partir de toutes les forces exercées sur elle et de sa micro-motricité propre. En conséquence, les modèles à base d'agents suivent le volume de réaction des cellules individuelles : il s'agit d'une description conceptuellement lagrangienne et non eulérienne. La croissance, la division et la mort cellulaires sont mises en œuvre sur la base de « lois » biologiques.

Il a été démontré que ces modèles représentaient la microarchitecture d'un organe de manière réaliste ainsi que des configurations *in vitro* avec beaucoup de réalisme (145,146), surtout avec le type de modèle le plus récent (DCM pour *deformable cell model*) (Figure 35), qui va même jusqu'aux détails intracellulaires (146).

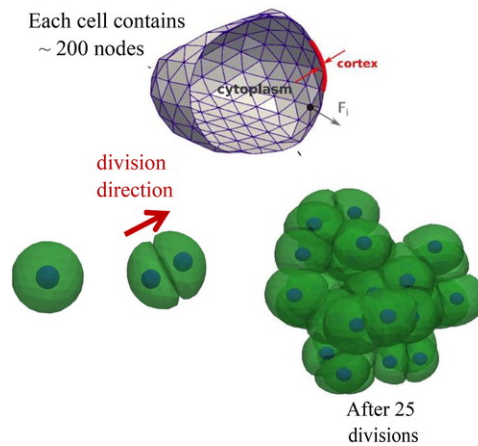


Figure 35 Deformable Cell Model (146)

Il s'agit donc de l'utilisation de logiciel de calculs d'éléments finis utilisant la cellule ou l'organite comme matériel. Toutes ces informations sont ensuite intégrées dans un modèle *in silico*.

Un autre avantage important de ces modèles basés sur les cellules est qu'ils peuvent capturer la biomécanique de manière réaliste. Les modèles qui représentent chaque cellule avec sa forme propre à une résolution intracellulaire rendent possible le fait de calibrer les paramètres biomécaniques des cellules à partir d'expériences d'étirement optique ou avec microscope à force atomique, ainsi que la réponse en termes de croissance des cellules sous contrainte mécanique lors d'expériences de compression. Ils peuvent même inclure des composants plus petits que la cellule individuelle, tels que la matrice extracellulaire par des réseaux de fibres. Ces modèles offrent donc la possibilité de simuler la toxicité dans des environnements expérimentaux *in vitro* et *in vivo* dans des jumeaux numériques, c'est-à-dire des modèles informatiques très réalistes (146) (Figure 35).

Ces modèles permettront d'étudier les effets possibles de la toxicité cellulaire sur la microarchitecture tissulaire et la mécanique des tissus, et de capturer les effets de la variabilité de cellule à cellule dans l'espace et dans le temps, *in vitro* et *in vivo* (Figure 36).

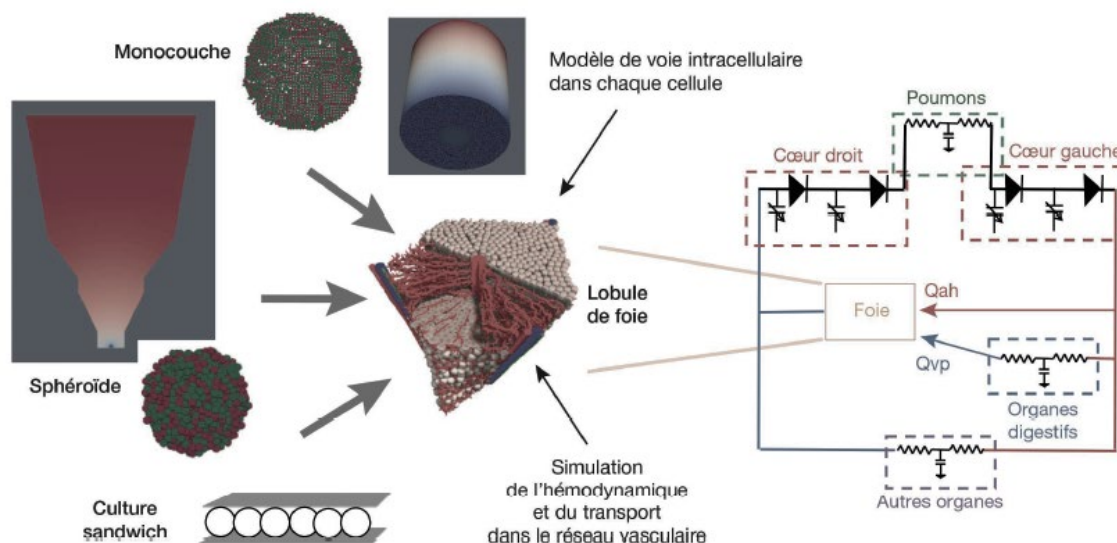


Figure 36 Simulations numériques de la toxicité *in vitro* et *in vivo* (132)

Il est important de souligner que le domaine des outils *in silico* pour la toxicologie est vaste et riche en ressources. Comme nous l'avons abordé, il est possible de prédire l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME) de substances chimiques par modélisation pharmacocinétique/pharmacodynamique physiologique (PBPK/PBPD). En parallèle, il est aussi possible de modéliser *in silico* des scénarios d'exposition réalistes pour les milieux environnementaux et pour l'homme.

Par conséquent, il apparaît que les méthodes *in silico* peuvent apporter une aide précieuse pour mieux comprendre les éléments nécessaires à l'évaluation du risque chimique.

6. Perspectives

a. Les méthodes IATA

Les IATA sont des approches pratiques et scientifiques de caractérisation des risques toxicologique. Elles reposent sur une analyse intégrée des informations existantes couplée à la génération de nouvelles informations à l'aide de stratégies de test.

L'IATA répond à une question définie dans un contexte réglementaire spécifique, en tenant compte du niveau d'incertitude acceptable associé au contexte de décision.

L'IATA peut inclure une combinaison de méthodes et intégrer les résultats d'une ou de plusieurs approches (QSAR, *in chemico*, *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*, technologies omiques).

Un cadre objectif et systématique est nécessaire pour caractériser la pertinence biologique et toxicologique individuelle des nouvelles méthodes à prédire un effet nocif. Le même cadre pourrait éclairer leur utilisation potentielle en combinaison avec d'autres outils et méthodes pour bénéficier d'une approche intégrée. Le concept Adverse Outcome Pathway (AOP) peut être appliqué comme cadre pour développer l'IATA (Figure 37).

Les approches réglementaires actuelles en matière d'essais et d'évaluation de la toxicité restent dans une large mesure basées sur une liste de contrôle d'essais *in vivo*, effectués conformément aux lignes directrices ou protocoles d'essai normalisés tels que les lignes directrices de l'OCDE. Bien que cette approche ait évolué au cours du dernier demi-siècle, il est peu probable qu'elle remplisse efficacement les mandats législatifs qui nécessitent un nombre accru d'évaluations à entreprendre sans une augmentation concomitante de l'utilisation des animaux et des ressources.

De nouvelles approches sont nécessaires pour combler l'écart entre le nombre de substances utilisées et le nombre de substances évaluées à ce jour.

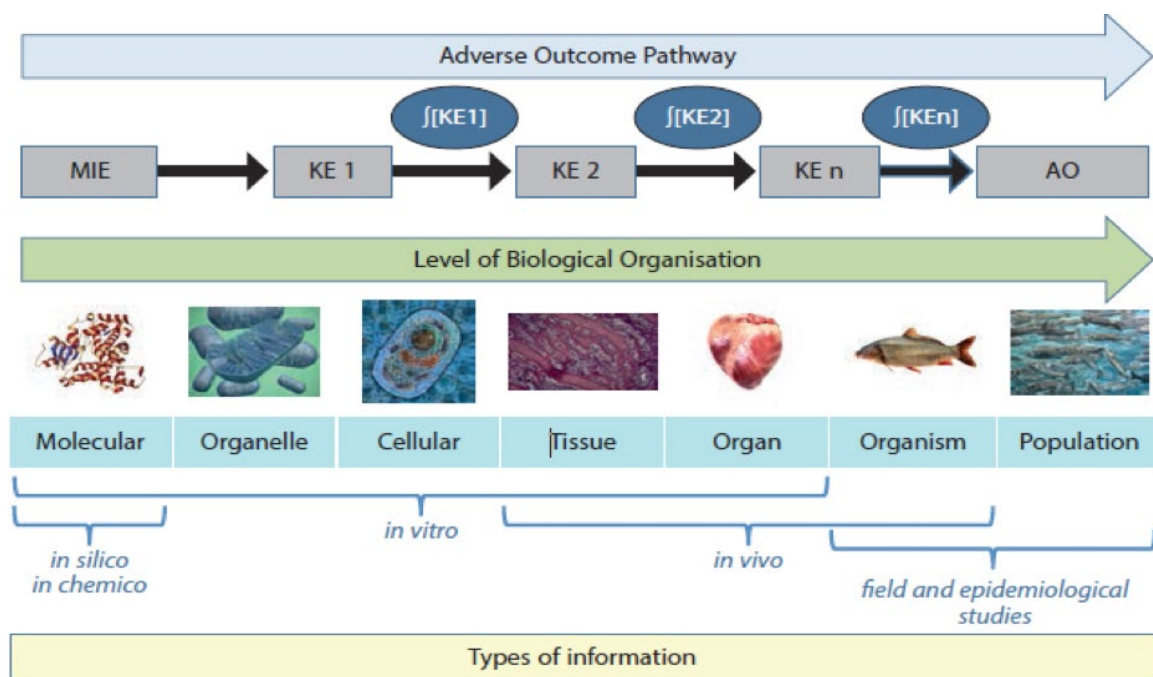


Figure 37 Stratégie IATA basé sur l'AOP

b. Nouvelle vision des études précliniques

En réponse aux argumentations selon lesquelles les 3R pouvaient représenter un frein à l'efficacité de la recherche scientifique, un nouveau « 3R » a été proposé : *relevance*, *robustness* et *reproducibility* (pour pertinence, robustesse et reproductibilité) afin de s'aligner aux données scientifiques.

- La pertinence fait référence à la façon dont le modèle répond à la question. Dans notre cas, cela concerne la capacité du modèle préclinique à prédire le résultat clinique attendu.
- La robustesse fait référence à la résistance du modèle à ne pas être affecté par des variations mineures des conditions d'essai qui peuvent se produire au cours de l'expérimentation dans un seul laboratoire.
- La reproductibilité concerne la capacité à utiliser le modèle prédictif de manière répétitive dans les mêmes conditions et à obtenir le même résultat.

La question de la reproductibilité dans les études animales est importante : un nombre important d'études évaluées par des pairs n'ont pas pu être reproduites. Il est démontré que divers facteurs peuvent contribuer au manque de reproductibilité dans les études sur les animaux, notamment une communication incomplète des détails de la conception et de la conduite de l'étude, des moyens inadéquats pour contrôler le biais de l'étude et un manque de rigueur méthodologique dans la conduite de l'étude (13,147).

Le manque de reproductibilité et de qualité des rapports sur les études sur les animaux sont particulièrement problématiques car l'industrie pharmaceutique externalise de plus en plus ses activités de recherche universitaires et en collaboration avec d'autres laboratoires. En effet l'industrie pharmaceutique a connu un contraste significatif entre

les résultats publiés et les résultats en interne dans les études précliniques animales et non animales (148,149).

Une expérience qui illustre cette préoccupation est un rapport du département d'hématologie / oncologie d'Amgen, où les scientifiques de l'industrie ont choisi 53 publications « marquantes », dont beaucoup dans des revues de premier plan, et n'ont pu confirmer les résultats complètement que dans 6 des publications (148). L'une des leçons que l'on peut tirer de ce manque de reproductibilité est la nécessité d'évaluer de manière critique les études et pas seulement de dépendre des processus de revue par les pairs. Lors de l'évaluation d'un article scientifique, le lecteur doit évaluer de manière critique la section *Matériels et Méthodes* pour s'assurer que les rapports sont solides. Les études devraient être examinées en ce qui concerne les méthodes de contrôle des biais (randomisation, mise en aveugle, etc.), si les contrôles sont appropriés, si tous les résultats et répétitions sont présentés, ainsi que pour vérifier l'utilisation de réactifs et de méthodes statistiques appropriées (150).

Le coût d'un nouveau médicament efficace a augmenté au cours des dernières décennies. Un certain nombre d'options ont été identifiées qui modifient le paradigme actuel de développement de médicaments pour augmenter la productivité de la R&D et réduire les coûts de développement de médicaments, suggérées par Barker (151) et par Paul (152). Le succès du développement dépend en partie de la qualité de l'exclusion rigoureuse des composés inappropriés dans les premiers stades. Dans cette première phase, les succès en matière de criblage et de sélection sont relativement rapides et peu coûteux à obtenir. Au-delà de cette phase, les conceptions expérimentales (y compris les essais cliniques) deviennent de plus en plus longues et coûteuses. Traditionnellement, ces phases ultérieures ont été considérées comme les plus fiables pour la sélection des meilleurs composés.

Les deux principales critiques de Barker sont que le processus est trop rigide en termes de calendrier et de méthodes. De plus, les partenariats entre les parties prenantes sont trop peu nombreux et la prise de risque en termes d'innovation fait défaut. Il propose un modèle flexible (Figure 38) pour le développement de médicaments :

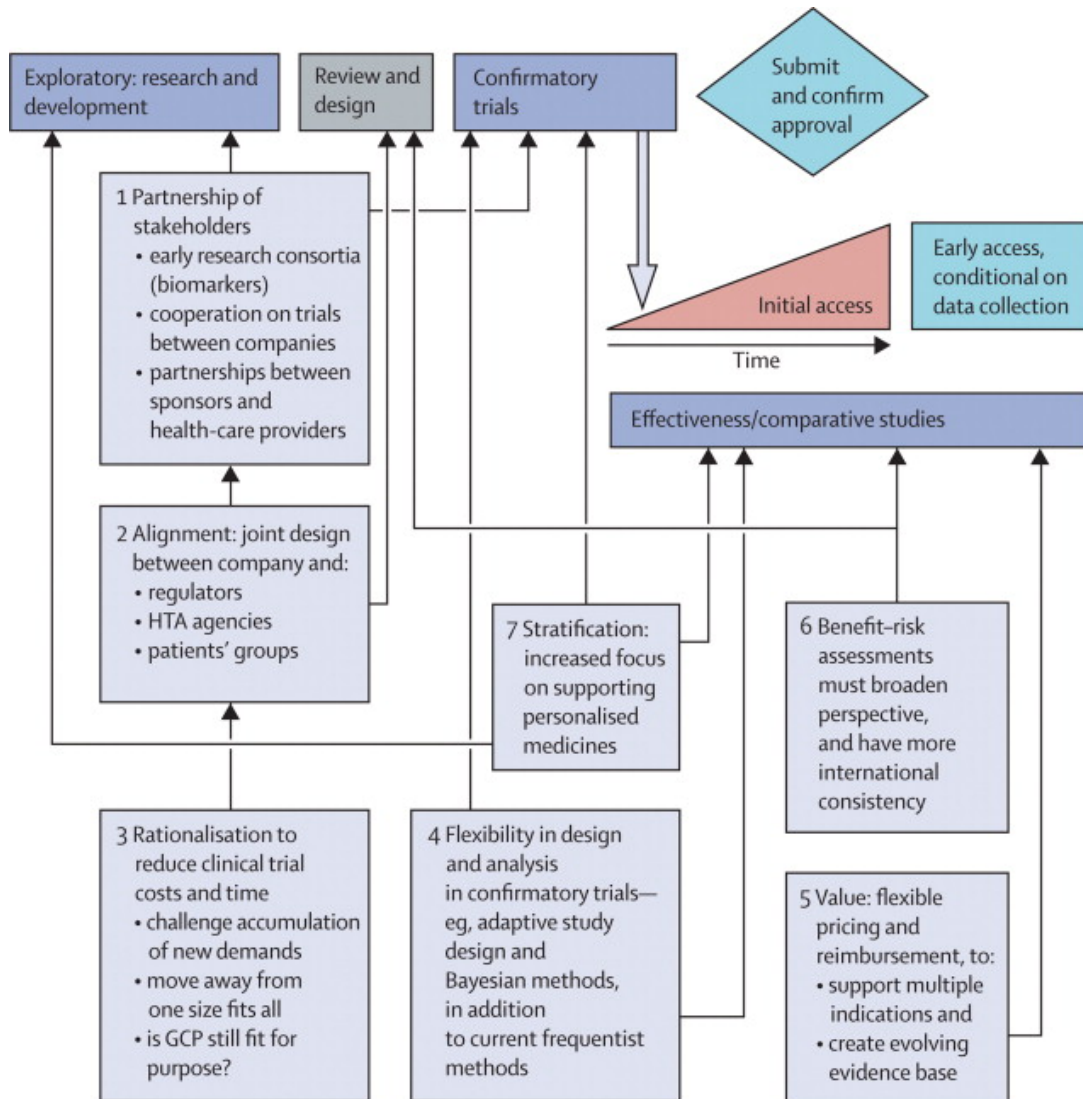


Figure 38 Modèle de Barker

Premièrement, la mise en place de **partenariats** entre les parties prenantes pour permettre le partage de l'expertise et des risques, et augmenter le potentiel de réussite dans des domaines thérapeutiques difficiles. Comme alternatives aux phases cliniques 1 à 4, l'auteur propose des essais exploratoires et de confirmation, en mettant en place une étape de conception collaborative avant la commande des essais de confirmation les plus coûteux.

Deuxièmement, développer des **conceptions d'essai de confirmation mutuellement acceptable** qui garantiraient l'approbation réglementaire.

Troisièmement, permettre une plus grande flexibilité des **critères de réussite** : les essais randomisés ne sont qu'une des approches pour évaluer les bénéfices/risques. Les études cas-témoins rassemblant des données sur l'efficacité et des systèmes de pharmacovigilance rigoureux sont d'autres pistes, notamment pour détecter les problèmes de sécurité rares.

Quatrièmement, les systèmes nationaux de **prix et de remboursement doivent être plus flexibles**. Il préconise notamment pour les médicaments ayant plus d'une

indication de définir des prix et des remboursements différents selon le SMR (service médical rendu) et l'ASMR (amélioration du service médical rendu).

Cinquièmement, **rationaliser les exigences réglementaires et réduire la bureaucratie**. Les demandes croissantes de données d'essais cliniques et le manque d'harmonie dans les exigences sont des éléments importants de l'augmentation des coûts, par exemple dans le cas d'événements indésirables ou la rédaction de rapports multiples et redondants. L'utilisation accrue des technologies de l'information dans la supervision des sites réduira le coût et l'empreinte carbone des essais.

Sixièmement, une évaluation optimisée selon les **perspectives de bénéfice-risque**, en particulier pour les maladies dont les besoins non satisfaits sont élevés.

Enfin, viser une **prescription personnalisée**. La science biomédicale évoluant vers le développement de traitements plus personnalisés, nous avons maintenant besoin d'un accord entre les innovateurs sur les biomarqueurs de la maladie et de la réponse, et d'un alignement précoce entre les régulateurs et les organismes d'évaluation sur la validation.

Il est à noter cependant que cette vision est antérieure à 2010 et la nouvelle réglementation européenne. En effet, les agences de réglementations ne sont pas rigides et n'exigent pas une unique méthode de développement. L'alignement entre les différents organismes de régulation internationaux est plus complexe à mettre en œuvre mais reste un objectif des organisations pour permettre d'assurer une sécurité du patient.

Le modèle de Paul (21) s'attache à rendre les efforts de R&D plus itératifs, à raccourcir le processus de R&D, et à intégrer des boucles de rétroaction à travers les différentes étapes de R&D. Leur modèle de R&D est plus traditionnel avec ce qu'ils appellent le modèle « *quick win, fast fail* » (Figure 39) mais nécessite une redistribution des investissements en R&D. La similitude entre les approches de Barker (151) et de Paul et al (21) est l'accent mis sur les phases antérieures pour réduire les incertitudes techniques avant de commencer les essais plus coûteux et plus tardifs. Une deuxième similitude entre ces approches est la flexibilité pendant les étapes de R&D qualifiées de conception d'essai « adaptative » ou « flexible ». Le concept de base est d'utiliser les données accumulées pour décider de la manière de modifier certains aspects de l'étude à mi-parcours, de manière préplanifiée, et sans compromettre la validité ou l'intégrité de l'étude. Une fois les résultats obtenus, les entreprises pourraient ajuster les principales caractéristiques de l'essai, telles que la taille de l'échantillon, l'attribution des traitements, ou encore les critères d'inclusion et d'exclusion.

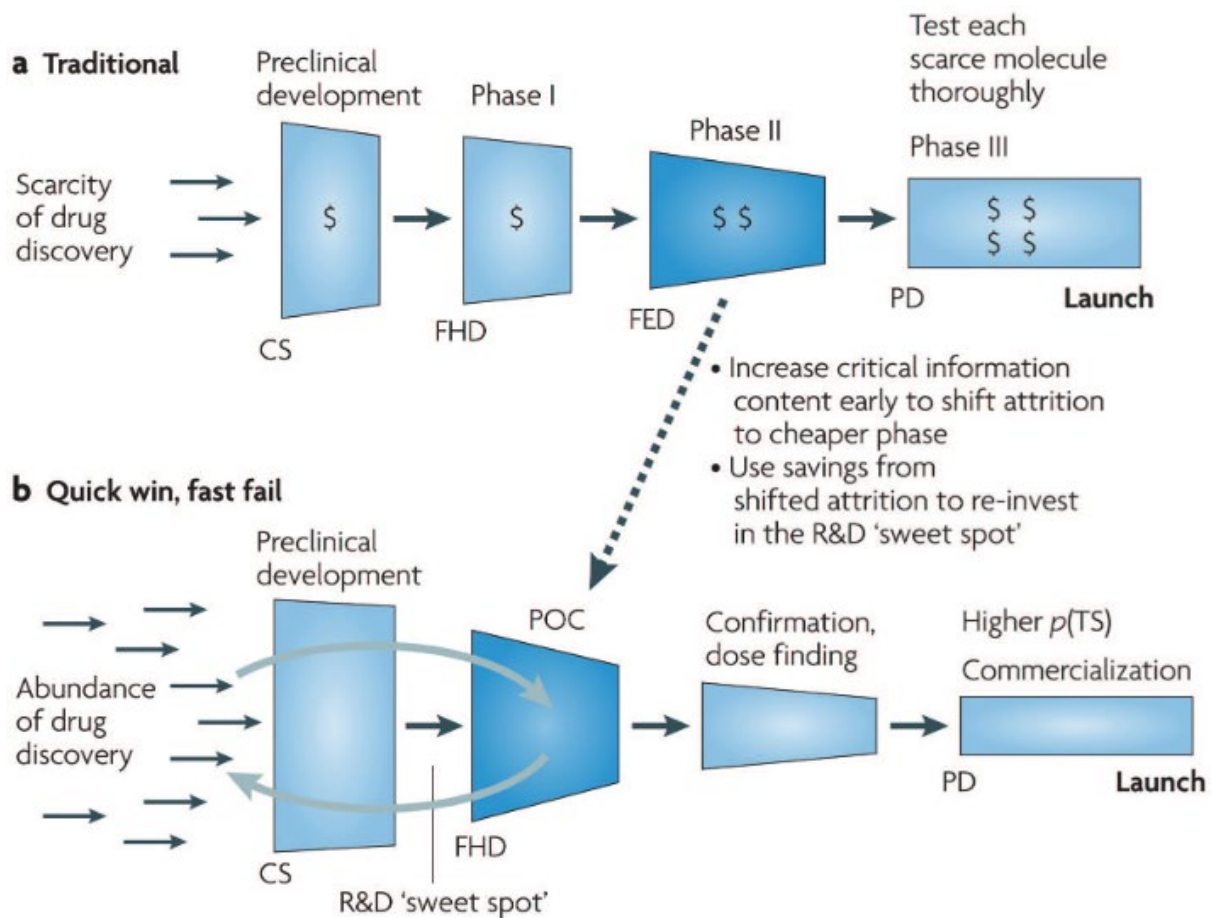


Figure 39 Modèle de Paul

c. Les essais précliniques et les Big Tech

Les Big Tech, autrement connues sous le nom de GAFAM, représentent les quatre géants du numérique : Google, Apple, Facebook et Amazon. Depuis plusieurs années maintenant, ces entreprises se sont fait une place dans le monde de la santé.

Avec la multiplication des informations que l'on peut acquérir grâce aux évolutions technologiques et à une meilleure compréhension des mécanismes biologiques, la gestion des informations et leur utilisation pertinente se complexifient. Ces données sont appelées *Real World Data* (RWD). Ce concept concerne les données médicales dérivées de multiples sources associées aux résultats sur le terrain (donc représentant une population hétérogène par exemple grâce à des enquêtes auprès des patients, des essais cliniques ou encore des études de cohorte observationnelles)(153).

L'utilisation judicieuse de ces données devrait rendre toutes les étapes du développement et de l'utilisation des produits pharmaceutiques plus efficaces, y compris la recherche et développement ainsi que la prise de décision réglementaire.

Il serait possible de créer un « système de santé apprenant » basé sur des dossiers de santé électroniques et d'autres données collectées au quotidien pour compléter les preuves basées sur des essais contrôlés randomisés.

Un effort coordonné de toutes les parties prenantes et une coopération internationale seraient nécessaires pour permettre la mise en œuvre du système de santé apprenant, au bénéfice de tous.

Cependant de tels systèmes coûteraient chers à mettre en place et nécessiteraient des expertises en gestion des données (big data), en cybersécurité mais aussi l'accès à un très grand nombre de serveurs.

Au cours des cinq dernières années seulement, Facebook, Apple, Amazon et Google sont justement passés de plateformes technologiques de pointe pures à des géants capables d'exercer leur influence sur le secteur de la santé (Figure 40).

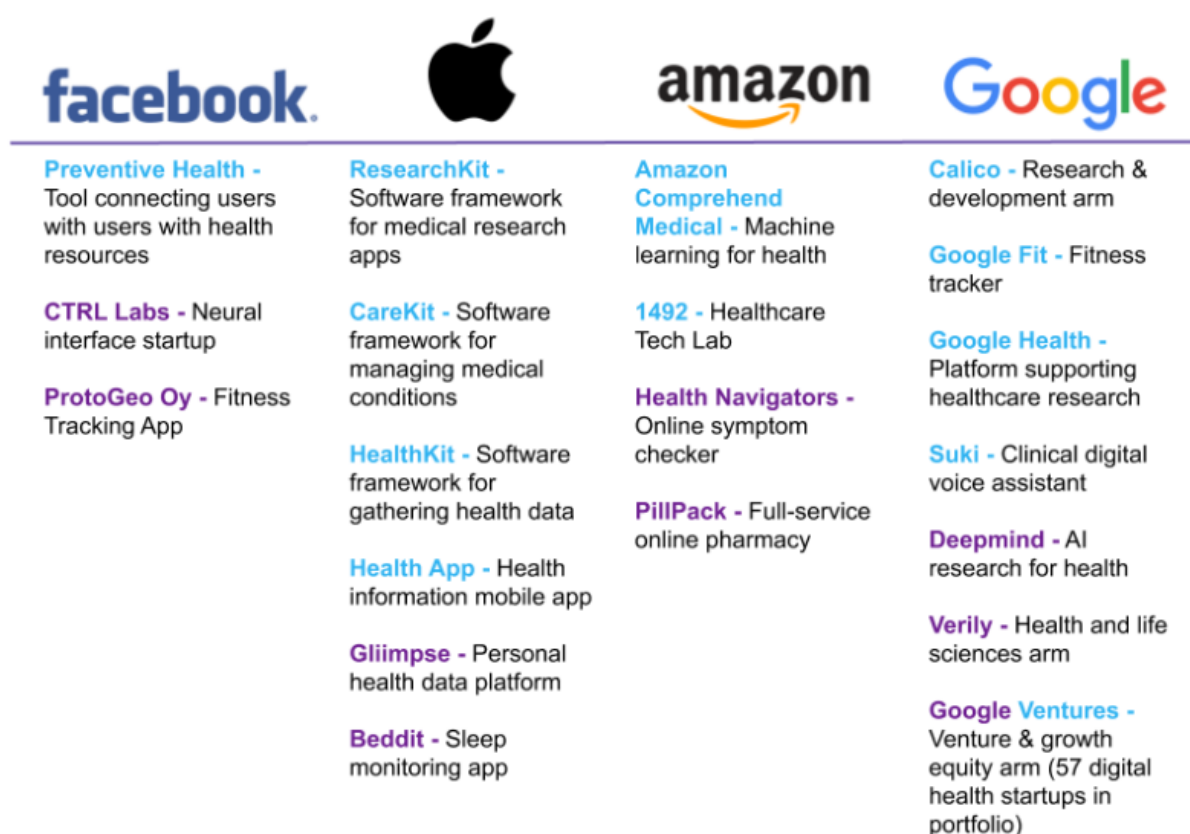


Figure 40 Filiales "santé" des Big Tech

Google en particulier est le plus avancé dans le développement d'intelligences artificielles (IA) qui permettraient une utilisation judicieuse des RWD. L'implication de Google dans la santé numérique et les technologies de la santé est démontrée par ses investissements importants notamment dans la génomique et la recherche clinique (154). La société compte actuellement 57 start-ups de santé numérique dans son portefeuille (23andME, Flatiron Health et Freenome) qui collectent toutes une grande quantité de données sur les patients et utilisent une IA avancée pour générer des informations commerciales et cliniques.

Cependant la complexité technique des RWD pourraient dessiner un changement dans l'industrie pharmaceutique : plutôt que par les Big Pharma, le marché se verrait à l'avenir contrôlé de plus en plus par les Big Tech. La question du risque d'un monopole sur les informations de santé se pose :

- Sera-t-il appliqué à la gestion de ces informations la même gestion de confidentialité et qualité qu'on exige à l'industrie pharmaceutique ?
- La concentration des connaissances et du potentiel de découvertes dans les mains d'une poignée d'entreprises deviendra-t-il un frein à la recherche ? Arrivera-t-on à une situation de monopole
- L'accès à ces banques de données sera-t-il payant ?

L'évolution rapide des technologies et l'accumulation des connaissances devraient permettre de diminuer le cout du développement des médicaments, tout en permettant l'amélioration des connaissances et une meilleure sécurité patient. Mais comme souvent, l'innovation effrénée soulève des questions éthiques.

“Pour ce qui est de l’avenir, il ne s’agit pas de le prévoir, mais de le rendre possible”

—

Saint Exupéry

7. Conclusion

Les changements de paradigme dans la science se produisent lorsque de nouvelles théories font des prédictions plus précises et reproductibles que les anciennes sur des phénomènes naturels observés empiriquement ou des résultats expérimentaux. Mais lorsque le terme de changement de paradigme est appliqué à l'éthique de l'expérimentation animale, le concept devient moins scientifiquement éclairé.

Il est difficile de comprendre comment les changements de paradigme éthique se produisent. Changer le paradigme éthique de l'expérimentation animale nécessiterait une analyse scientifique de son manque d'efficacité dans l'amélioration de la santé humaine et la preuve qu'une meilleure méthode existe. Si d'un point de vue purement scientifique, de multiples méta-analyses indiquent que la recherche animale ne peut être extrapolée que rarement à l'Homme, le débat de l'utilisation des animaux en science est loin d'être si tranché. La recherche fondamentale et appliquée nécessite de recourir à des animaux de laboratoire lorsqu'elle veut intégrer, au niveau de l'organisme, des résultats obtenus *in silico* ou *in vitro*. Devant l'absence de modèle parfait, il est essentiel de permettre une homogénéisation des pratiques et de s'assurer de la cohérence scientifique des essais par le processus de validation.

La connaissance des mécanismes physiopathologiques à l'origine des futurs médicaments nécessite la mise en œuvre de ces modèles intégrés. La recherche animale reste ainsi indispensable à la production de connaissances. Elle se fait dans un cadre strict ayant comme préoccupation première le bien-être de l'animal et la règle des 3R. Une approche omique intégrée combinée à des modèles de culture cellulaire *in vitro* à la pointe de la technologie a le potentiel d'améliorer considérablement notre compréhension des perturbations induites par les substances chimiques et médicamenteuses. De plus, la combinaison de la toxicité mécanistique et de la biocinétique permet une compréhension inégalée de la dynamique et de la cinétique qui peuvent aider à construire des modèles de prédiction pour l'évaluation des risques (28).

Chaque stratégie peut ainsi apporter des informations pertinentes sur une base scientifique, mais les limites de chaque méthode doivent être connues et évaluées (Tableau 3).

Méthodes in silico	
Intérêts	Limites
<ul style="list-style-type: none">• Stratégie d'étude de la relation structure-activité• Faible coût• Simple et réponse rapide• Intégration dans les AOP• Perspective de couplage avec les organes sur puce	<ul style="list-style-type: none">• Variable selon la qualité des bases de données• Dépend de données <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>• Non validé• Demande une expertise initiale

Méthodes in vitro	
Intérêts	Limites
<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle des conditions expérimentales Standardisation des essais et haut-débits possibles • Rapidité et faible coût • Etudes mécanistiques possibles • Faible variabilité (reproductible) • Absence d'effet systémique • Petite quantité d'échantillons nécessaire • Faible quantité de produit toxique généré • Etude de tissus d'origine humaine possible • Etude de tissus d'origine humaine possible • Développement d'organoïdes et de systèmes microfluidiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas d'étude d'interaction possibles entre les tissus et les organes pour l'instant • Transposition des informations effet/dose à l'Homme difficile • Effets systémiques non évaluable pour l'instant • Pas de modèle de toxicité chronique disponible pour l'instant • Limites expérimentales : la solubilité des molécules d'intérêt, l'interaction possible avec le plastique, difficulté pour reproduire les barrière physiologiques, variabilité de la composition des milieux de culture • Très sensible, beaucoup de faux positif • Coût plus important, demande une expertise plus importante et difficile à standardiser

Tableau 3 Synthèse des avantages et limites des méthodes alternatives

L'hypothèse selon laquelle les alternatives seules pourraient remplacer l'expérimentation animale est, comme nous l'avons vu, fautive à l'heure actuelle. Cependant, qu'en est-il à l'avenir ? Les essais animaux ayant une prédictivité limitée et très variable selon les modèles, une approche préclinique analytique, à l'image du *Quality by Design* en qualité, permettrait d'aborder la crise actuelle de fiabilité des essais préclinique et d'augmenter la fiabilité des études et la mises sur le marché. Coupler les modèles animaux à des approches *in silico* et d'autres alternatives permettrait, par un système de séquençage itératif et réfléchi, d'augmenter les rendements de la recherche pharmaceutique tout en améliorant la sécurité patient dès les phases cliniques. Les stratégies précliniques suivent cette évolution (Figure 41). Les progrès en cours et à venir permettent d'espérer une grande fiabilité et une prédictivité très importante de l'évaluation de la toxicité, notamment grâce aux cultures 3D *in vitro*, aux promesses des organes sur puces et à la perspective de pouvoir effectuer des essais sur des patients virtuels randomisés en couplant *in vitro* et *in silico*.

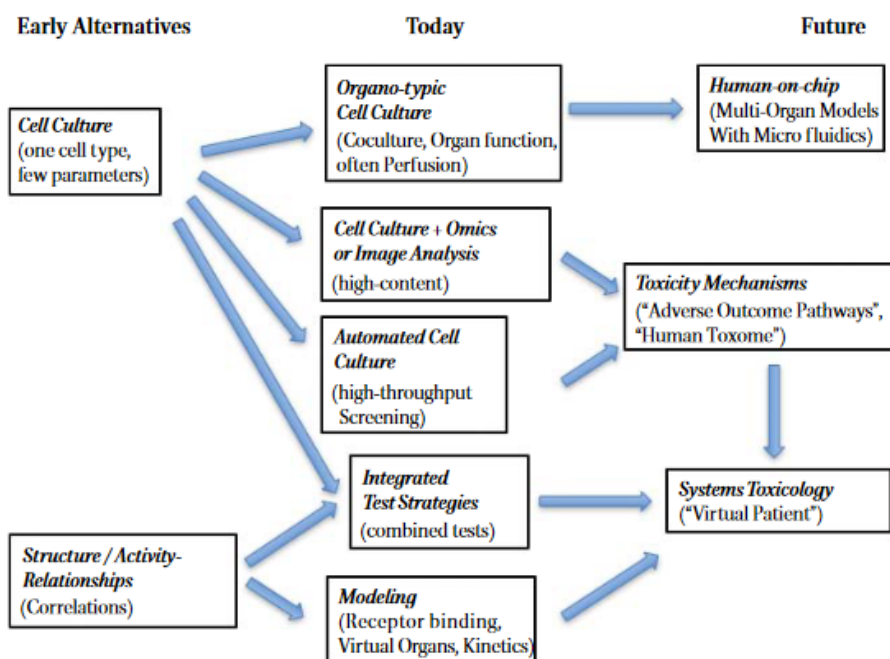


Figure 41 Evolution des stratégies alternatives

Pourtant il faut aussi prendre du recul sur les conséquences possibles de la mise en place de ce nouveau paradigme : si des préoccupations éthiques quant à la souffrance animale sont un des moteurs du changement, d'autres questions éthiques peuvent être soulevées dans nos sociétés de l'information.

Il est aussi à noter que cette thèse n'a pas pu aborder toutes les méthodes participant aux 3R. Une des stratégies importantes non évoquée est l'exploitation des techniques de l'imagerie in vivo. Ces dernières ont aussi évolué et permettent une exploration non invasive de la plupart des fonctions physiologiques et de nombreuses interactions cellulaires et/ou moléculaires. En effet, cela permet d'améliorer le raffinement des essais : la pertinence des essais et leur potentiel à fournir des informations fiables sont potentialisés grâce à l'imagerie.

De plus, l'étude de nouveaux modèles organiques pourrait permettre d'avoir des modèles plus prédictifs. Les découvertes et les recherches sur des modèles tels que le blob (*Physarum polycephalum*), pourraient donner de nouveaux axes à des essais de génotoxicité ou de cancérogénicité ou encore sur l'oursin (*Strongylocentrotus purpuratus*) pour la neurodégénérescence (155).

Les alternatives aux essais toxicologiques précliniques in vivo des médicaments à usage humain sont nombreuses et leur recoupement est, et sera de plus en plus, une mine d'information pour la compréhension du fonctionnement biologique, physiopathologique, pharmacologique et toxicologique. Grâce à l'implication des organismes de régulation et l'intérêt des industries pour ces alternatives, une évolution - quoique progressive et pas toujours aussi rapide que souhaitée - est en cours.

2. Bibliographie :

1. Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, et al. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ*. 27 janv 2007;334(7586):197.
2. van der Worp HB, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O'Collins V, et al. Can Animal Models of Disease Reliably Inform Human Studies? *PLoS Med* [Internet]. 30 mars 2010 [cité 28 mars 2021];7(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2846855/>
3. Pound P, Ebrahim S, Sandercock P, Bracken MB, Roberts I. Where is the evidence that animal research benefits humans? *BMJ*. 26 févr 2004;328(7438):514-7.
4. Macleod M. Why animal research needs to improve. *Nature*. 28 sept 2011;477(7366):511.
5. Worp HB van der, Macleod MR. Preclinical studies of human disease: Time to take methodological quality seriously. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1 oct 2011;51(4):449-50.
6. Pound P, Bracken M. Is animal research sufficiently evidence based to be a cornerstone of biomedical research? *BMJ (Clinical research ed)*. 30 mai 2014;348:g3387.
7. Sena E, van der Worp HB, Howells D, Macleod M. How can we improve the pre-clinical development of drugs for stroke? *Trends Neurosci*. sept 2007;30(9):433-9.
8. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science*. 20 déc 2013;342(6165):1432-3.
9. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *PNAS*. 26 févr 2013;110(9):3507-12.
10. Hackam DG, Spence JD. Combining multiple approaches for the secondary prevention of vascular events after stroke: a quantitative modeling study. *Stroke*. juin 2007;38(6):1881-5.
11. Howell D, Smith A, Jack A, Patmore R, Macleod U, Mironska E, et al. Howell DA, Smith AG, Jack A, Patmore R, Macleod U, Mironska E, Roman E Time-to-diagnosis and symptoms of myeloma, lymphomas and leukaemias: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *BMC Hematol* 13: 9. *BMC hematology*. 31 oct 2013;13:9.
12. Henderson JM, Luke SG, Schmidt J, Richards JE. Co-registration of eye movements and event-related potentials in connected-text paragraph reading. *Front Syst Neurosci*. 2013;7:28.

13. Kilkenny C, Parsons N, Kadyszewski E, Festing MFW, Cuthill IC, Fry D, et al. Survey of the Quality of Experimental Design, Statistical Analysis and Reporting of Research Using Animals. PLOS ONE. 30 nov 2009;4(11):e7824.
14. Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. J Immunol. 1 mars 2004;172(5):2731-8.
15. Osuchowski MF, Remick DG, Lederer JA, Lang CH, Aasen AO, Aibiki M, et al. ABANDON THE MOUSE RESEARCH SHIP? NOT JUST YET! Shock. juin 2014;41(6):463-75.
16. Sundberg M, Bogetofte H, Lawson T, Jansson J, Smith G, Astradsson A, et al. Improved Cell Therapy Protocols for Parkinson's Disease Based on Differentiation Efficiency and Safety of hESC-, hiPSC-, and Non-Human Primate iPSC-Derived Dopaminergic Neurons. STEM CELLS. 2013;31(8):1548-62.
17. Mak IW, Evaniew N, Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. Am J Transl Res. 2014;6(2):114-8.
18. U.S. EPA to eliminate all mammal testing by 2035 | Science | AAAS [Internet]. [cité 27 août 2021]. Disponible sur: <https://www.sciencemag.org/news/2019/09/us-epa-eliminate-all-mammal-testing-2035>
19. Livre Ier : Produits pharmaceutiques (Articles L5111-1 à L5161-1) - Légifrance [Internet]. [cité 30 mars 2021]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEXT000006072665/LEGISCTA000006140630/#LEGISCTA000006140630
20. Recherche et développement [Internet]. [cité 30 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.leem.org/recherche-et-developpement>
21. The R&D Cost of a New Medicine [Internet]. 2012 [cité 2 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.ohe.org/publications/rd-cost-new-medicine>
22. Pessina A, Albella B, Bueren J, Brantom P, Casati S, Gribaldo L, et al. Prevalidation of a model for predicting acute neutropenia by colony forming unit granulocyte/macrophage (CFU-GM) assay. Toxicology in Vitro. 1 déc 2001;15(6):729-40.
23. L C, A V, Ja B, B A. In vitro sensitivity of granulo-monocytic progenitors as a new toxicological cell system and endpoint in the ACuteTox Project. Toxicology and applied pharmacology [Internet]. 15 juill 2009 [cité 14 juill 2021];238(2). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19442680/>
24. Prieto P, Kinsner-Ovaskainen A. Short commentary to "Human in vivo database now on ACuteTox home page" [Toxicol. In Vitro 27 (2013) 2350–2351]. Toxicology in Vitro. 1 mars 2015;29(2):415.
25. Kull FC, Cuatrecasas P. Estimation of cell number by neutral red content. Appl Biochem Biotechnol. 1 avr 1983;8(2):97-103.
26. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicol Lett. mars 1985;24(2-3):119-24.

27. SEURAT-1 - Towards the Replacement of in vivo Repeated Dose Systemic Toxicity Testing [Internet]. [cité 19 juin 2021]. Disponible sur: <http://www.seurat-1.eu/pages/about/the-underlying-scientific-concept.php>
28. Pfaller W, Prieto P, Dekant W, Jennings P, Blaauboer BJ. The Predict-IV project: Towards predictive toxicology using in vitro techniques. *Toxicology in Vitro*. 25 déc 2015;30(1, Part A):1-3.
29. EU-ToxRisk - About EU-ToxRisk [Internet]. [cité 19 juin 2021]. Disponible sur: <https://www.eu-toxrisk.eu/page/en/about-eu-toxrisk.php>
30. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*. mai 1983;113(3-4):173-215.
31. Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, van Benthem J, Zuang V, et al. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects—2010. *Arch Toxicol*. 1 mai 2011;85(5):367-485.
32. Sécurité sociale 2016 [Internet]. Cour des comptes. [cité 17 juin 2021]. Disponible sur: <https://www.ccomptes.fr/fr/publications/securite-sociale-2016>
33. Paules RS, Aubrecht J, Corvi R, Garthoff B, Kleinjans JC. Moving forward in human cancer risk assessment. *Environ Health Perspect*. juin 2011;119(6):739-43.
34. Klimisch H-J, Andreae M, Tillmann U. A Systematic Approach for Evaluating the Quality of Experimental Toxicological and Ecotoxicological Data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1 févr 1997;25(1):1-5.
35. Pauwels M, Dejaegher B, Vander Heyden Y, Rogiers V. Critical analysis of the SCCNFP/SCCP safety assessment of cosmetic ingredients (2000-2006). *Food Chem Toxicol*. avr 2009;47(4):898-905.
36. Jacobson-Kram D, Jacobs A. Use of Genotoxicity Data to Support Clinical Trials or Positive Genetox Findings on a Candidate Pharmaceutical or Impurity Now What?: *International Journal of Toxicology* [Internet]. 1 déc 2016 [cité 23 juill 2021]; Disponible sur: <http://journals.sagepub.com/doi/full/10.1080/109158110590952933>
37. Législation - ECHA [Internet]. [cité 23 juill 2021]. Disponible sur: <https://echa.europa.eu/fr/regulations/reach/legislation>
38. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Genotoxicity. A COLIPA analysis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1 juill 2010;57(2-3):315-24.
39. Jacobs MN, Colacci A, Louekari K, Luijten M, Hakkert BC, Paparella M, et al. International regulatory needs for development of an IATA for non-genotoxic carcinogenic chemical substances. *ALTEX*. 1 nov 2016;33(4):359-92.
40. Doktorova TY, Yildirimman R, Ceelen L, Vilardell M, Vanhaecke T, Vinken M, et al. Testing chemical carcinogenicity by using a transcriptomics HepaRG-based model? *EXCLI J*. 28 mai 2014;13:623-37.

41. Herwig R, Gmuender H, Corvi R, Bloch KM, Brandenburg A, Castell J, et al. Inter-laboratory study of human in vitro toxicogenomics-based tests as alternative methods for evaluating chemical carcinogenicity: a bioinformatics perspective. *Arch Toxicol.* sept 2016;90(9):2215-29.
42. André P, Aubry J-M, Berteina-Raboin S, Bouix-Peter C, Bino SD, Humbert P, et al. *Chimie, dermo-cosmétique et beauté.* EDP Sciences; 2017. 265 p.
43. Kanebratt KP, Andersson TB. HepaRG cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction in humans. *Drug Metab Dispos.* janv 2008;36(1):137-45.
44. Clark M, Steger-Hartmann T. A big data approach to the concordance of the toxicity of pharmaceuticals in animals and humans. *Regul Toxicol Pharmacol.* juill 2018;96:94-105.
45. Monticello TM, Jones TW, Dambach DM, Potter DM, Bolt MW, Liu M, et al. Current nonclinical testing paradigm enables safe entry to First-In-Human clinical trials: The IQ consortium nonclinical to clinical translational database. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 nov 2017;334:100-9.
46. Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G, et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol.* août 2000;32(1):56-67.
47. Brelet C. *Médecines du monde: histoire et pratiques des médecines traditionnelles.* R. Laffont; 2002. 925 p.
48. Bernard C. *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale.* J. B. Baillière et fils; 1865. 412 p.
49. La Vergata A. De Darwin au débat sur le problème de la souffrance animale. In: Förstel J, Plouvier M, éditeurs. *L'animal : un objet d'étude* [Internet]. Paris: Éditions du Comité des travaux historiques et scientifiques; 2020 [cité 12 juin 2021]. (Actes des congrès nationaux des sociétés historiques et scientifiques). Disponible sur: <http://books.openedition.org/cths/10248>
50. The importance of animals in biomedical and behavioral research (a statement from the Public Health Service). *Physiologist.* juin 1994;37(3):107.
51. House of Lords - Animals In Scientific Procedures - Minutes of Evidence [Internet]. [cité 1 avr 2021]. Disponible sur: <https://publications.parliament.uk/pa/ld200102/ldselect/ldanimal/999/2050702.htm>
52. Statement of the Royal Society's position on the use of animals in research | Royal Society [Internet]. [cité 1 avr 2021]. Disponible sur: <https://royalsociety.org/topics-policy/ethics-conduct/animal-testing/>
53. Enquête statistique sur l'utilisation des animaux à des fins scientifiques [Internet]. Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. [cité 2 avr 2021]. Disponible sur: <http://www.enseignementsup->

recherche.gouv.fr/cid70613/enquete-statistique-sur-l-utilisation-des-animaux-a-des-fins-scientifiques.html

54. Rajendran N, Thomas D, Suresh Madhavan S, Herman RA. Chapter 24 - Ethics in Clinical Research. In: Thomas D, éditeur. *Clinical Pharmacy Education, Practice and Research* [Internet]. Elsevier; 2019 [cité 12 juin 2021]. p. 345-64. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128142769000246>
55. Burrows V. Sulfanilamide Disaster. :5.
56. Europe C of. *Conventions et accords européens*. Council of Europe; 1990. 592 p.
57. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 Concerning the Harmonization of Legislation on Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes: Berlin, Workshop 22 - 24 April 1991 ; Proceedings of the EC Workshop in Berlin, Germany, April 22 - 24, 1991. 1991. 80 p.
58. Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.
59. Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.
60. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen; 1959. 286 p.
61. Marano F, Juin H. *Quelles alternatives en expérimentation animale ? : pratiques et éthique*. Éditions Quae; 2020. 186 p.
62. Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J*. 2002;43(4):244-58.
63. Scott S, Kranz JE, Cole J, Lincecum JM, Thompson K, Kelly N, et al. Design, power, and interpretation of studies in the standard murine model of ALS. *Amyotroph Lateral Scler*. 2008;9(1):4-15.
64. Chapman KL, Holzgrefe H, Black LE, Brown M, Chellman G, Copeman C, et al. Pharmaceutical toxicology: designing studies to reduce animal use, while maximizing human translation. *Regul Toxicol Pharmacol*. juin 2013;66(1):88-103.
65. Emerson M. Refinement, reduction and replacement approaches to in vivo cardiovascular research. *Br J Pharmacol*. oct 2010;161(4):749-54.
66. Madden JC, Hewitt M, Przybylak K, Vandebriel RJ, Piersma AH, Cronin MTD. Strategies for the optimisation of in vivo experiments in accordance with the 3Rs philosophy. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1 juin 2012;63(1):140-54.
67. Fenwick N, Danielson P, Griffin G. Survey of Canadian animal-based researchers' views on the Three Rs: replacement, reduction and refinement. *PLoS One*. 2011;6(8):e22478.

68. Matthews RA. Medical progress depends on animal models - doesn't it? *J R Soc Med.* févr 2008;101(2):95-8.
69. Ps S, Rd D, S C, J N, Dr S, Dp R. The evaluation of anticancer drugs in dogs and monkeys for the prediction of qualitative toxicities in man. *Clinical pharmacology and therapeutics* [Internet]. févr 1970 [cité 2 avr 2021];11(1). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4983384/>
70. Heywood R. Target organ toxicity. *Toxicol Lett.* août 1981;8(6):349-58.
71. Greaves P, Williams A, Eve M. First dose of potential new medicines to humans: how animals help. *Nat Rev Drug Discov.* mars 2004;3(3):226-36.
72. Expérimentation animale en Europe : Quelles alternatives ? Quelle éthique ? Quelle gouvernance ? [Internet]. [cité 2 avr 2021]. Disponible sur: <http://www.se-nat.fr/rap/r09-155/r09-155.html>
73. Dardenne E. From Jeremy Bentham to Peter Singer. *Revue d'études benthamiennes* [Internet]. 13 sept 2010 [cité 12 juin 2021];(7). Disponible sur: <http://journals.openedition.org/etudes-benthamiennes/204>
74. Hardouin-Fugier É. Quelques étapes du droit animalier : Pie V, Schœlcher et Clemenceau. *Pouvoirs.* 2009;n° 131(4):29-41.
75. Smyth DH. *Alternatives to Animal Experiments.* Scolar Press [for] the Research Defence Society; 1978. 218 p.
76. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* mars 2015;54(2):120-32.
77. Berkowitz C. Disputed discovery: vivisection and experiment in the 19th century. *Endeavour.* sept 2006;30(3):98-102.
78. Guerrini A. *Animal Experiments and Antivivisection Debates in the 1820s.* In: *Frankenstein's Science.* Routledge; 2008.
79. Franco NH. *Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective.* *Animals (Basel).* 19 mars 2013;3(1):238-73.
80. Smith M, Health JBS of P. About Us [Internet]. Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health. [cité 23 juill 2021]. Disponible sur: <http://caat.jhsph.edu/about/>
81. Halioua B. *Le procès des médecins de Nuremberg: l'irruption de l'éthique biomédicale.* Érès éditions.; 2017. 238 p.
82. Furger C. *Les tests cellulaires: De la recherche aux applications industrielles en toxicité et santé.* ISTE Group; 2016. 265 p.

83. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals [Internet]. [cité 24 juin 2021]. Disponible sur: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals_72d77764-en
84. Balls M, Blaauboer B, Brusick D, Frazier J, Lamb D, Pemberton M, et al. Report and Recommendations of the CAAT1/ERGATT2 Workshop on the Validation of Toxicity Test Procedures3: Alternatives to Laboratory Animals [Internet]. 13 août 2020 [cité 25 juin 2021]; Disponible sur: <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/026119299001800131.1>
85. Balls M, Goldberg AM, Fentem JH, Broadhead CL, Burch RL, Festing MFW, et al. The Three Rs: The Way Forward: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 111,2. Alternatives to Laboratory Animals [Internet]. 13 août 2020 [cité 25 juin 2021]; Disponible sur: <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/026119299502300614>
86. Curren RD, Southee JA, Spielmann H, Fentem JH, Balls M. The Role of Prevalidation in the Development, Validation and Acceptance of Alternative Methods. :8.
87. EUR-Lex - 02006R1907-20140410 - EN - EUR-Lex [Internet]. [cité 25 juin 2021]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A02006R1907-20140410>
88. The Validation of Toxicological Prediction Models - Graeme Archer, Michael Balls, Leon H. Bruner, Rodger D. Curren, Julia H. Fentem, Hermann-Georg Holzhütter, Manfred Liebsch, David P. Lovell, Jacqueline A. Southee, 1997 [Internet]. [cité 25 juin 2021]. Disponible sur: <https://journals-sagepub-com.docelec.u-bordeaux.fr/doi/abs/10.1177/026119299702500507>
89. Judson R, Kavlock R, Martin M, Reif D, Houck K, Knudsen T, et al. Perspectives on validation of high-throughput assays supporting 21st century toxicity testing. ALTEX. 2013;30(1):51-6.
90. Leist M, Efremova L, Karreman C. Food for thought ... considerations and guidelines for basic test method descriptions in toxicology. ALTEX - Alternatives to animal experimentation. 1 nov 2010;27(4):309-17.
91. Hartung T, Bremer S, Casati S, Coecke S, Corvi R, Fortaner S, et al. A modular approach to the ECVAM principles on test validity. Altern Lab Anim. nov 2004;32(5):467-72.
92. Bas A, Burns N, Gulotta A, Junker J, Drasler B, Lehner R, et al. Understanding the Development, Standardization, and Validation Process of Alternative In Vitro Test Methods for Regulatory Approval from a Researcher Perspective. Small. 1 avr 2021;17(15):2006027.
93. Lang C, Kolaj-Robin O, Cirefice G, Taconet L, Pel E, Jouette S, et al. Replacement, Reduction, Refinement - Animal welfare progress in European Pharmacopoeia monographs: activities of the European Pharmacopoeia Commission from 2007 to 2017. Pharmeur Bio Sci Notes. 2018;2018:12-36.

94. Hess C. 4 - Inscrire les communs de la connaissance dans les priorités de recherche. :13.
95. Lindner MD. Clinical attrition due to biased preclinical assessments of potential efficacy. *Pharmacology & Therapeutics*. 1 juill 2007;115(1):148-75.
96. S S, Je K, J C, Jm L, K T, N K, et al. Design, power, and interpretation of studies in the standard murine model of ALS. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases [Internet]*. 2008 [cité 23 juill 2021];9(1). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18273714/>
97. Shineman DW, Basi GS, Bizon JL, Colton CA, Greenberg BD, Hollister BA, et al. Accelerating drug discovery for Alzheimer's disease: best practices for preclinical animal studies. *Alzheimers Res Ther*. 28 sept 2011;3(5):28.
98. Gamet-Payraastre L, REMESY C. Caractéristiques des cultures primaires d'hépatocytes chez le rat et le mouton. *Annales de Recherches Vétérinaires*. 1989;20(2):218-9.
99. Uysal O, Sevimli T, Sevimli M, Gunes S, Eker Sariboyaci A. Chapter 17 - Cell and Tissue Culture: The Base of Biotechnology. In: Barh D, Azevedo V, éditeurs. *Omics Technologies and Bio-Engineering [Internet]*. Academic Press; 2018 [cité 11 avr 2021]. p. 391-429. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128046593000178>
100. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 1 déc 1961;25(3):585-621.
101. Suter-Dick L, Alves PM, Blaauboer BJ, Bremm K-D, Brito C, Coecke S, et al. Stem cell-derived systems in toxicology assessment. *Stem Cells Dev*. 1 juin 2015;24(11):1284-96.
102. Saydé T, El Hamoui O, Alies B, Gaudin K, Lespes G, Battu S. Biomaterials for Three-Dimensional Cell Culture: From Applications in Oncology to Nanotechnology. *Nanomaterials (Basel)*. 13 févr 2021;11(2):481.
103. Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol*. août 2014;32(8):760-72.
104. Moshksayan K, Kashaninejad N, Ebrahimi Warkiani M, Lock J, Moghadas H, Firoozabadi B, et al. Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture. *Sensors and Actuators B Chemical*. 30 janv 2018;263.
105. A multicellular spheroid array to realize spheroid formation, culture, and viability assay on a chip - ScienceDirect [Internet]. [cité 23 août 2021]. Disponible sur: <https://www-sciencedirect-com.docelec.u-bordeaux.fr/science/article/pii/S0142961206007848?via%3Dihub>

106. Simunovic M, Brivanlou AH. Embryoids, organoids and gastruloids: new approaches to understanding embryogenesis. *Development*. 15 mars 2017;144(6):976-85.
107. Pineda ET, Nerem RM, Ahsan T. Differentiation patterns of embryonic stem cells in two- versus three-dimensional culture. *Cells Tissues Organs*. 2013;197(5):399-410.
108. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology*. 1 févr 2013;31(2):108-15.
109. Hsiao AY, Tung Y-C, Kuo C-H, Mosadegh B, Bedenis R, Pienta KJ, et al. Micro-ring structures stabilize microdroplets to enable long term spheroid culture in 384 hanging drop array plates. *Biomed Microdevices*. avr 2012;14(2):313-23.
110. Tung Y-C, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa Y, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst*. 7 févr 2011;136(3):473-8.
111. Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*. juill 2017;32(4):266-77.
112. Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*. 16 juin 2016;165(7):1586-97.
113. Nakano T, Ando S, Takata N, Kawada M, Muguruma K, Sekiguchi K, et al. Self-Formation of Optic Cups and Storable Stratified Neural Retina from Human ESCs. *Cell Stem Cell*. 14 juin 2012;10(6):771-85.
114. Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. oct 2014;9(10):2329-40.
115. Folch A, Toner M. Microengineering of cellular interactions. *Annu Rev Biomed Eng*. 2000;2:227-56.
116. Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21 févr 2006;103(8):2480-7.
117. Whitesides GM, Ostuni E, Takayama S, Jiang X, Ingber DE. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu Rev Biomed Eng*. 2001;3:335-73.
118. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 27 juill 2006;442(7101):368-73.
119. Powers MJ, Domansky K, Kaazempur-Mofrad MR, Kalezi A, Capitano A, Upadhyaya A, et al. A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture. *Biotechnol Bioeng*. 5 mai 2002;78(3):257-69.

120. Leclerc E, Sakai Y, Fujii T. Microfluidic PDMS (polydimethylsiloxane) bioreactor for large-scale culture of hepatocytes. *Biotechnol Prog.* juin 2004;20(3):750-5.
121. Baudoin R, Griscom L, Monge M, Legallais C, Leclerc E. Development of a renal microchip for in vitro distal tubule models. *Biotechnol Prog.* oct 2007;23(5):1245-53.
122. O'Neill AT, Monteiro-Riviere NA, Walker GM. Characterization of microfluidic human epidermal keratinocyte culture. *Cytotechnology.* mars 2008;56(3):197-207.
123. Jang K, Sato K, Igawa K, Chung U, Kitamori T. Development of an osteoblast-based 3D continuous-perfusion microfluidic system for drug screening. *Anal Bioanal Chem.* févr 2008;390(3):825-32.
124. Leclerc E, David B, Griscom L, Lepioufle B, Fujii T, Layrolle P, et al. Study of osteoblastic cells in a microfluidic environment. *Biomaterials.* févr 2006;27(4):586-95.
125. Chao PG, Tang Z, Angelini E, West AC, Costa KD, Hung CT. Dynamic osmotic loading of chondrocytes using a novel microfluidic device. *J Biomech.* juin 2005;38(6):1273-81.
126. Novak R, Ingram M, Marquez S, Das D, Delahanty A, Herland A, et al. Robotic fluidic coupling and interrogation of multiple vascularized organ chips. *Nat Biomed Eng.* avr 2020;4(4):407-20.
127. Herland A, Maoz BM, Das D, Somayaji MR, Prantil-Baun R, Novak R, et al. Quantitative prediction of human pharmacokinetic responses to drugs via fluidically coupled vascularized organ chips. *Nat Biomed Eng.* avr 2020;4(4):421-36.
128. Brar G, Blais EM, Joseph Bender R, Brody JR, Sohal D, Madhavan S, et al. Multi-omic molecular comparison of primary versus metastatic pancreatic tumours. *Br J Cancer.* juill 2019;121(3):264-70.
129. Beerenwinkel N, Zagordi O. Ultra-deep sequencing for the analysis of viral populations. *Current Opinion in Virology.* 1 nov 2011;1(5):413-8.
130. Ahmed N. A Flood of Microbial Genomes—Do We Need More? *PLOS ONE.* 9 juin 2009;4(6):e5831.
131. Courant F, Antignac J-P, Dervilly-Pinel G, Le Bizec B. Basics of mass spectrometry based metabolomics. *Proteomics.* nov 2014;14(21-22):2369-88.
132. Mombelli E, Ringeissen S. The computational prediction of toxicological effects in regulatory contexts: Current use and future potential of (Q)SAR tools. *Actualite Chimique.* 1 nov 2009;
133. Leist M, Ghallab A, Graepel R, Marchan R, Hassan R, Bennekou SH, et al. Adverse outcome pathways: opportunities, limitations and open questions. *Arch Toxicol.* nov 2017;91(11):3477-505.

134. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 1 juill 2000;44(1):235-49.
135. A decade of drug-likeness. *Nature Reviews Drug Discovery*. nov 2007;6(11):853-853.
136. Morgan P, Van Der Graaf PH, Arrowsmith J, Feltner DE, Drummond KS, Wegner CD, et al. Can the flow of medicines be improved? Fundamental pharmacokinetic and pharmacological principles toward improving Phase II survival. *Drug Discovery Today*. 1 mai 2012;17(9):419-24.
137. Puzyn T, Leszczyński J, Cronin MTD. Recent advances in QSAR studies: methods and applications [Internet]. Springer; 2010 [cité 20 août 2021]. Disponible sur: <https://repozytorium.bg.ug.edu.pl/info/book/UOG5265ef24a28a49f580202a907d27f31d/?ps=20&lang=en&pn=1&cid=177902>
138. Senior AW, Evans R, Jumper J, Kirkpatrick J, Sifre L, Green T, et al. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature*. janv 2020;577(7792):706-10.
139. Morita T, Shigeta Y, Kawamura T, Fujita Y, Honda H, Honma M. In silico prediction of chromosome damage: comparison of three (Q)SAR models. *Mutagenesis*. 6 mars 2019;34(1):91-100.
140. Dix DJ, Houck KA, Martin MT, Richard AM, Setzer RW, Kavlock RJ. The ToxCast program for prioritizing toxicity testing of environmental chemicals. *Toxicol Sci*. janv 2007;95(1):5-12.
141. Tollefsen KE, Scholz S, Cronin MT, Edwards SW, de Knecht J, Crofton K, et al. Applying Adverse Outcome Pathways (AOPs) to support Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1 déc 2014;70(3):629-40.
142. Physiologically-based modelling in mice suggests an aggravated loss of clearance capacity after toxic liver damage - PubMed [Internet]. [cité 25 août 2021]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28740200/>
143. Schenk A, Ghallab A, Hofmann U, Hassan R, Schwarz M, Schuppert A, et al. Physiologically-based modelling in mice suggests an aggravated loss of clearance capacity after toxic liver damage. *Sci Rep*. 24 juill 2017;7:6224.
144. Hoehme S, Brulport M, Bauer A, Bedawy E, Schormann W, Hermes M, et al. Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration. *PNAS*. 8 juin 2010;107(23):10371-6.
145. Hoehme S, Bertaux F, Weens W, Grasl-Kraupp B, Hengstler JG, Drasdo D. Model Prediction and Validation of an Order Mechanism Controlling the Spatiotemporal Phenotype of Early Hepatocellular Carcinoma. *Bull Math Biol*. mai 2018;80(5):1134-71.

146. Van Liedekerke P, Neitsch J, Johann T, Warnt E, Gonzalez-Valverde I, Hoehme S, et al. A quantitative high resolution computational cell model to unravel the mechanics in living tissues. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*. 1 mai 2019;22(sup1):S367-9.
147. Macleod U, Mitchell ED, Burgess C, Macdonald S, Ramirez AJ. Risk factors for delayed presentation and referral of symptomatic cancer: evidence for common cancers. *Br J Cancer*. 3 déc 2009;101 Suppl 2:S92-101.
148. Begley CG, Ellis LM. Raise standards for preclinical cancer research. *Nature*. mars 2012;483(7391):531-3.
149. Prinz F, Schlange T, Asadullah K. Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets? *Nat Rev Drug Discov*. sept 2011;10(9):712-712.
150. Begley CG. Six red flags for suspect work. *Nature*. mai 2013;497(7450):433-4.
151. Barker R. A flexible blueprint for the future of drug development. *The Lancet*. 30 janv 2010;375(9712):357-9.
152. Paul BK. Environmental hazards and disasters: contexts, perspectives and management. Chichester, West Sussex; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2011.
153. Eichler H-G, Bloechl-Daum B, Broich K, Kyrle PA, Oderkirk J, Rasi G, et al. Data Rich, Information Poor: Can We Use Electronic Health Records to Create a Learning Healthcare System for Pharmaceuticals? *Clin Pharmacol Ther*. avr 2019;105(4):912-22.
154. The Future Of Clinical Trials: The Promise Of AI And The Role Of Big Tech [Internet]. CB Insights Research. 2021 [cité 1 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.cbinsights.com/research/clinical-trials-ai-tech-disruption/>
155. Bernardo MD, Carlo MD. The Sea Urchin Embryo: A Model for Studying Molecular Mechanisms Involved in Human Diseases and for Testing Bioactive Compounds [Internet]. *Sea Urchin - From Environment to Aquaculture and Biomedicine*. IntechOpen; 2017 [cité 1 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.intechopen.com/chapters/56605>

3. Annexes

Annexe 1. Lignes directrices des essais toxicologiques

Domaine	Méthode/Modèle	Guideline
Corrosion cutanée (*NT)	Corositex	OCDE TG 435
	Epidermes reconstruits	OCDE TG 431
	Explant de peau de rat	OCDE TG 430
Irritation cutanée (*NT)	Epidermes reconstruits	OCDE TG 439 + ICH S10
Phototoxicité	3T3 NRU	OCDE TG 432 + ICH S10
	ROS et photostabilité <i>in vitro</i>	ICH S10
Irritation oculaire (*NT)	Cornée de bœuf isolée	OCDE TG 437
	Cornée de poulet isolée	OCDE TG 438
	Passage de la fluorescéine sur cellules	OCDE TG 460
	Cornée reconstruite	OCDE TG 492
Sensibilisation cutanée (*NT)	Essai de réactivité peptidique directe-DPRA	OCDE TG 442C
	Test d'activation sur lignée cellulaire humaine	OCDE TG 442E
	Essai transcriptomique sur cellules	OCDE TG 442D
	Essai par gène rapporteur de l'interleukine 8 sur cellules	OCDE TG 442E
	Test d'activation de la lignée cellulaire U937	OCDE TG 442E
Perturbateur endocrinien	Essai de TA par transfection stable (essais STTA & TA)	OCDE TG 455 + OCDE TG 457
	Essai de stéroïdogénèse H295R sur cellules	OCDE TG 456
	AR-STTA activité androgénique sur cellules hrER	OCDE TG 458 + OCDE TG 493
Génotoxicité	Essais <i>in vitro</i> des micronoyaux	OCDE TG 487
	Test d'aberration chromosomique	OCDE TG 473

Annexe 2. Annexe2 : Lignes directrices des essais toxicologiques de l'OCDE

SECTION 1 - PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

No.	Title	Original Adoption	Most recent update
101	UV-VIS Absorption Spectra	12 May 1981	---
102	Melting Point/Melting Range	12 May 1981	27 July 1995
103	Boiling Point	12 May 1981	27 July 1995
104	Vapour Pressure	12 May 1981	23 March 2006
105	Water Solubility	12 May 1981	27 July 1995
106	Adsorption/Desorption Using a Batch Equilibrium Method	12 May 1981	21 January 2000
107	Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method	12 May 1981	27 July 1995
108	Complex Formation Ability in Water	12 May 1981	---
109	Density of Liquids and Solids	12 May 1981	2 October 2012
110	Particle Size Distribution/Fibre Length and Diameter Distributions	12 May 1981	---
111	Hydrolysis as a function of pH	12 May 1981	13 April 2004
112	Dissociation Constants in Water	12 May 1981	---
113	Screening Test for Thermal Stability and Stability in Air	12 May 1981	---
114	Viscosity of Liquids	12 May 1981	2 October 2012
115	Surface Tension of Aqueous Solutions	12 May 1981	27 July 1995
116	Fat Solubility of Solid and Liquid Substances	12 May 1981	---
117	Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC method	30 March 1989	13 April 2004

118	Determination of the Number- Average Molecular Weight and the Molecular Weight Distribution of Polymers using Gel Permeation Chromatography	14 June 1996	---
119	Determination of the Low Molecular Weight Content of a Polymer Using Gel Permeation Chromatography	14 June 1996	---
120	Solution/Extraction Behaviours of Polymers in Water	14 June 1996	21 January 2000
121	Estimation of the Adsorption Coefficient (K_{oc}) on Soil and on Sewage Sludge using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	22 January 2001	---
122	Determination of pH, Acidity and Alkalinity	26 July 2013	----
123	Partition Coefficient (1-Octanol / Water): Slow-Stirring Method	23 March 2006	---

SECTION 2 - Effets écotoxicologiques

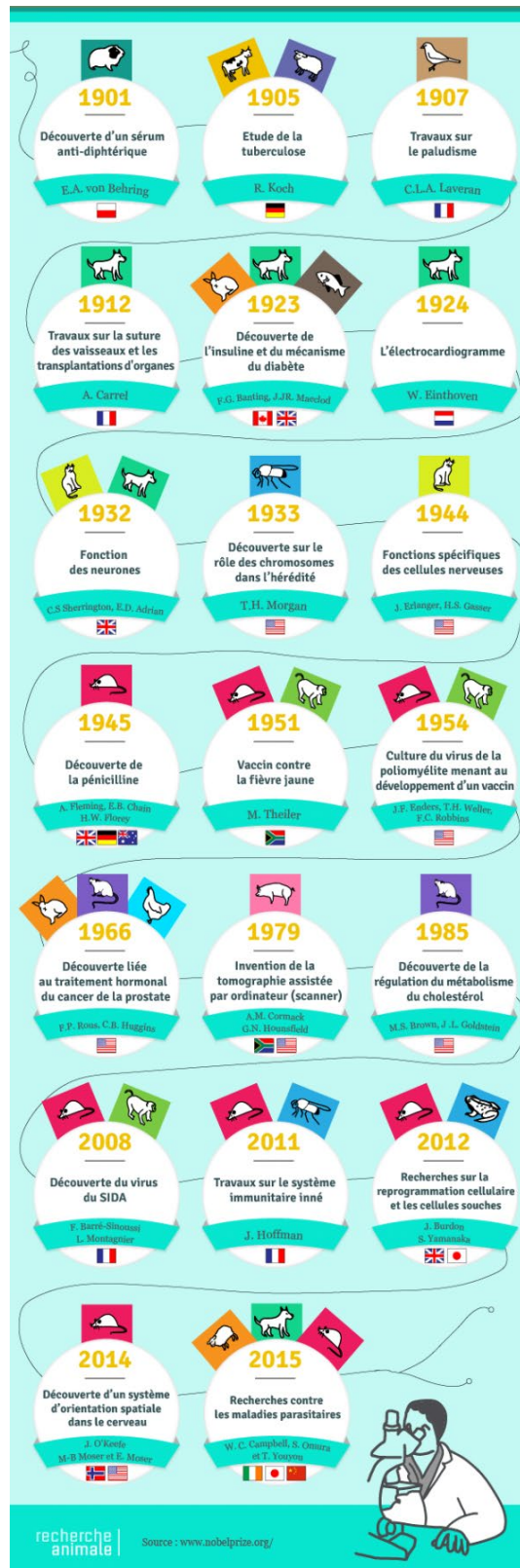
No.	Title	Original Adoption	Most Recently Updated
201	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test	12 May 1981	23 March 2006 (corrected on 28 July 2011)
202	<i>Daphnia</i> sp. Acute Immobilisation Test	12 May 1981	13 April 2004
203	Fish, Acute Toxicity Test	12 May 1981	14 June 2019
204	Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study	4 April 1984	Date of deletion April 2014
205	Avian Dietary Toxicity Test	4 April 1984	---
206	Avian Reproduction Test	4 April 1984	---
207	Earthworm, Acute Toxicity Tests	4 April 1984	---
208	Terrestrial Plants, Growth Test	4 April 1984 (Corrected June 2021)	19 July 2006
209	Activated Sludge, Respiration Inhibition Test(Carbon and Ammonium Oxidation)	4 April 1984	22 July 2010
210	Fish, Early-Life Stage Toxicity Test	17 July 1992	26 July 2013
211	<i>Daphnia magna</i> Reproduction Test	21 September 1998	2 October 2012
212	Fish, Short- term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages	21 September 1998	---
213	Honeybees, Acute Oral Toxicity Test	21 September 1998	---
214	Honeybees, Acute Contact Toxicity Test	21 September 1998	---

215	Fish, Juvenile Growth Test	21 January 2000	---
216	Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test	21 January 2000	---
217	Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test	21 January 2000	---
218	Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment	13 April 2004	---
219	Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water	13 April 2004	---
220	Enchytraeid Reproduction Test	13 April 2004	26 July 2016
221	<i>Lemna</i> sp. Growth Inhibition Test	23 March 2006	---
222	Earthworm Reproduction Test (<i>Eisenia fetida</i> / <i>Eisenia andrei</i>)	13 April 2004	26 July 2016
223	Avian Acute Oral Toxicity Test	22 July 2010	26 July 2016
224	Determination of the activity of anaerobic bacteria – Reduction of gasproduction from anaerobically sewage sludge	8 January 2007	---
225	Sediment-Water <i>Lumbriculus</i> Toxicity Test Using Spiked Sediment	16 October 2007	---
226	Predatory Mite (<i>Hypoaspis</i> (<i>Geolaelaps</i>) <i>Aculeifer</i>) Reproduction Test in Soil	3 October 2008	26 July 2016
227	Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test	19 July 2006	---

228	Determination of Developmental Toxicity of a Test Chemical to Dipteran Dung Flies (<i>Scathophaga stercoraria</i> L. (<i>Scathophagidae</i>) and <i>Musca autumnalis</i> De Geer (<i>Muscidae</i>))	3 October 2008	26 July 2016
229	Fish Short Term Reproduction Assay	7 September 2009	2 October 2012
230	21-Day Fish Assay: A Short Term Screening Assay for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition	7 September 2009	---
231	Amphibian Metamorphosis Assay	7 September 2009	---
232	Collembolan Reproduction Test in Soil	7 September 2009	26 July 2016
233	Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment	22 July 2010	---
234	Fish Sexual Development Test	28 July 2011	---
235	<i>Chironomus</i> sp., Acute Immobilisation Test	28 July 2011	---
236	Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test	26 July 2013	---
237	Honeybee (<i>Apis mellifera</i>) Larval Toxicity Test, Single Exposure	26 July 2013	---
238	Sediment-free <i>Myriophyllum spicatum</i> Toxicity Test	26 September 2014	---
239	Water-Sediment <i>Myriophyllum spicatum</i> Toxicity Test	26 September 2014	---

240	Medaka Extended One-Generation Reproduction Test	28 July 2015	---
241	Larval Amphibian Growth and Development Assay	28 July 2015	---
242	<i>Potamopyrgus antipodarum</i> Reproduction Test	26 July 2016	---
243	<i>Lymnaea stagnalis</i> Reproduction Test	26 July 2016	---
244	Protozoa Activated Sludge Inhibition Test	9 October 2017	---
245	Honeybee, 10-day oral toxicity test	9 October 2017	---
246	Bumblebee, acute contact toxicity test	9 October 2017	---
247	Bumblebee, acute oral toxicity test	9 October 2017	---
248	Xenopus Eleutheroembryo Thyroid Assay	14 June 2019	---
249	Fish Cell Line Acute Toxicity: The RTgill-W1 cell line assay	14 June 2021	---
250	EASZY assay: Detection of Endocrine Active Substances, acting through estrogen receptors, using transgenic tg(cyp19a1b:GFP) Zebrafish embryos	14 June 2021	---

Annexe 3. Les prix Nobel ayant eu recours à l'expérimentation animale



Annexe 4. Statistique de l'expérimentation animale en France en 2018

Spèce	Objet A	Objet C	Objet B	Objet H	Objet F	Objet E	Objet D	Objet G	Total
[A1] Souris (<i>Mus musculus</i>)	488 500	261 229	304 564	56 884	15 976	4 612		8	1 131 723
[A10] Chiens (<i>Canis familiaris</i>)	382	3 338	1 033	10	135				4 898
[A11] Furets (<i>Mustela putorius furo</i>)	8	16	113		13				150
[A12] Autres carnivores	6		11			7			24
[A13] Chevaux, ânes et croquemets (<i>Equidae</i>)	404	90	143		4	54			695
[A14] Porcs (<i>Sus scrofa domestica</i>)	4 517	1 866	3 097		3 099		8		12 617
[A15] Chèvres (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	767	10	24		6				807
[A16] Moutons (<i>Ovis aries</i>)	3 879	548	388		80				4 895
[A17] Bovins (<i>Bos primigenius</i>)	1 605	272	302		16				2 195
[A18] Prosimiens	109								109
[A19] Ouidis, Marmosets et tamarins	51	117	4						172
[A2] Bats (<i>Rhinus norvegicus</i>)	55 183	50 542	43 194	1 591	15 068	667			166 245
[A20] Macaques cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>)	252	1 980	601						2 923
[A21] Macaques rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	27	29	7						63
[A22] Singes vervet (ex. <i>Chlorocebus sabaeus</i>)		11	17						28
[A23] Babouins (<i>Papio spp.</i>)			24						24
[A25-1] Autres espèces de singes de l'ancien monde	18		2			3			20
[A27] Autres mammifères	176								179
[A28] Poules, coqs et poulets (<i>Gallus gallus domestica</i>)	41 735	17 134	14 364		212	439	2 740		76 624
[A29] Autres oiseaux	5 821	28 421	3 520		35	185			37 982
[A9] Cochons d'Inde (<i>Cavia porcellus</i>)	61	35 664	568		1 119	0	11		37 423
[A30] Reptiles	6 151								6 151
[A31] Grenouilles (<i>Rana temporaria</i> and <i>Rana pipiens</i>)	260								260
[A32] Xéropes (<i>Xenopus laevis</i> and <i>Xenopus tropicalis</i>)	2 972		2 673		32				5 677
[A33] Autres amphibiens	517				56				573
[A34] Poissons tétrés (<i>Danio rerio</i>)	32 493	897	11 272	720	116		1 650		51 108
[A35] Autres poissons	110 297	1 833	34 477		331	29 117	1 133		177 188
[A36] Céphalopodes	96								96
[A4] Hamsters dorés (<i>Mesocricetus auratus</i>)	650	3 552	1 700		10				5 912
[A5] Hamsters de Chine (<i>Cricetus griseus</i>)	17								17
[A6] Gerbilles de Mongolie (<i>Meriones unguiculatus</i>)	253	145	30						428
[A7] Autres rongeurs	1 461	32	89						1 582
[A8] Lapins (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	2 774	130 620	1 840		374				135 008
[A9] Chats (<i>Felis catus</i>)	229	647	131						1 007
Total Général	761 701	538 993	424 278	59 205	36 632	35 084	5 542	8	1 865 403
Pourcentage (%)	40,8	28,8	22,7	3,1	1,9	1,8	0,2	0,0	

Définition des objets :

A - Recherche fondamentale.

B - Recherches appliquées sur les pathologies humaines, animales ou végétales, ou sur le bien-être des animaux.

C - Etudes toxicologiques ou réglementaires pour des médicaments à usage humain ou vétérinaire et pour des produits alimentaires.

D - Protection de l'environnement naturel dans l'intérêt de la santé ou du bien-être de l'homme ou de l'animal.

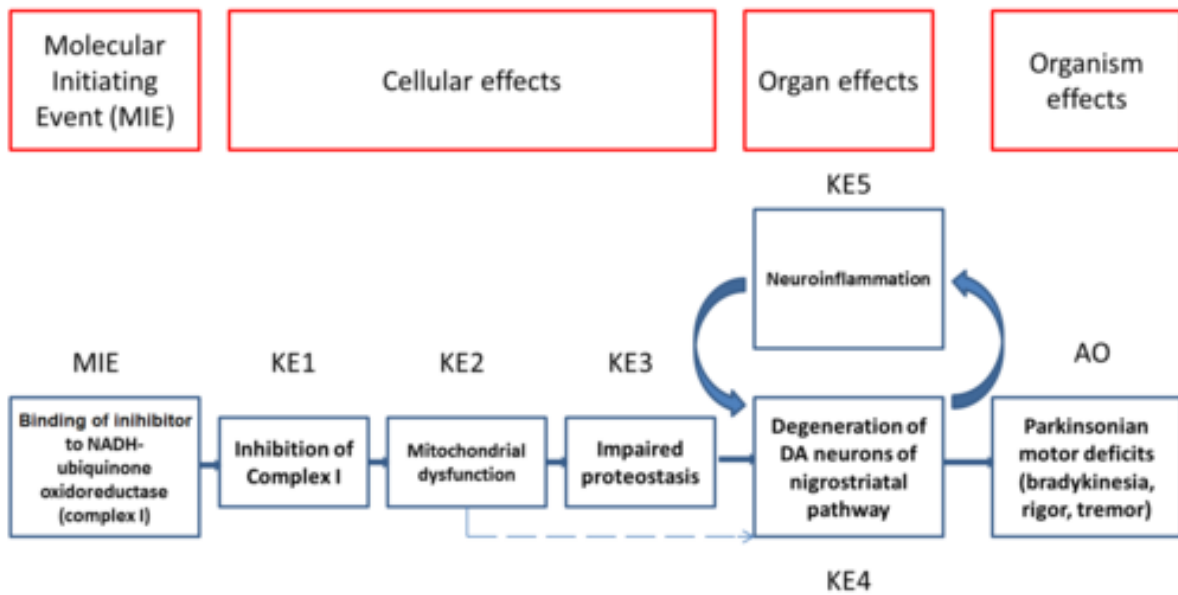
E - Recherche en vue de la conservation des espèces.

F - Enseignement supérieur ou formation professionnelle des personnels impliqués dans des procédures expérimentales avec des animaux ou assurant le soin de ces animaux.

G - Enquêtes médico-légales.

H - Maintenance de colonies d'animaux génétiquement altérés à phénotype dommageable, non utilisés dans d'autres procédures

Annexe 5. Exemple d'AOP tiré d'AOP-wiki



Cet AOP décrit le lien entre l'inhibition du complexe I (CI) de la chaîne respiratoire mitochondriale et le déficit moteur comme dans les troubles parkinsoniens. La liaison d'un inhibiteur au complexe I a été définie comme l'événement d'initiation moléculaire (MIE) qui déclenche un dysfonctionnement mitochondrial. Une protéostase est altérée, ce qui provoque ensuite la dégénérescence des neurones dopaminergiques (DA) de la voie nigro-striatale. La neuroinflammation est déclenchée tôt dans le processus neurodégénératif et l'exacerbe de manière significative. Ces événements cellulaires clés (KE) liés de manière causale entraînent des symptômes de déficit moteur, typiques des troubles parkinsoniens, décrits dans cet AOP comme un effet indésirable (*adverse outcome* AO). Puisque la libération de dopamine dans le striatum par les neurones DA de la Substantia Nigra pars compacta (SNpc) est essentielle pour le contrôle moteur, les événements clés font référence à ces deux structures cérébrales.

Ici, les informations proviennent d'expériences *in vitro* et *in vivo* et sont complétées par des études humaines dans des tissus cérébraux d'individus atteints de la maladie de Parkinson sporadique (Keeney et al., 2006). »

Annexe tirée de « *Inhibition of the mitochondrial complex I of nigro-striatal neurons leads to parkinsonian motor deficits* » (Terron et al)

Annexe 6. Test d'absorption cutanée d'après l'OCDE

Zoom sur la culture 3D de l'épiderme :

L'OCDE a déclaré que, pour les études d'absorption percutanée, des modèles artificiels de peau humaine pourraient être utilisés, étant donné que l'équivalence est prouvée. De tels modèles in vitro ont été développés dans plusieurs laboratoires de recherche au cours des cinquante dernières années, et des modèles de peau sont devenus progressivement disponibles. Les modèles en culture permettent une séparation nette entre les types cellulaires qui peuvent ainsi être analysés individuellement. Certains d'entre eux sont devenus disponibles dans le commerce et ont fait l'objet de divers programmes de validation afin d'évaluer leur adéquation en toxicologie cutanée et en pharmacologie. Ils présentent un schéma de différenciation similaire à celui de l'épiderme humain normal in vivo et représentent des modèles reproductibles dans un environnement contrôlé. Par conséquent, des facteurs tels que la variabilité de la source cutanée, c'est-à-dire différents donneurs ou différents sites anatomiques du corps, qui pourraient influencer les résultats finaux, peuvent être exclus.

Actuellement, il existe deux principaux types de modèles tissulaires 3D : sans et avec matrice (*scaffold*). Sans matrice, on retrouve les sphéroïdes. Pour la formation de matrice de polymères, plusieurs méthodes sont utilisées :

- Les techniques de réticulation courantes comprennent soit la réticulation chimique, à l'aide de composants réactifs tels que le glutaraldéhyde, soit l'amalgame de produits naturels tels que les GAG ou la fibrine
- L'électrofilage : méthode de production de fibres qui utilise une force électrique pour tirer des fils de polymères chargés en solution ou fondus jusqu'à des diamètres de l'ordre de centaines de nanomètres.
- La bioimpression assistée par laser, à base de jet de bioencre et la bio-impression à base de micro-extrusion

Mise en place du test :

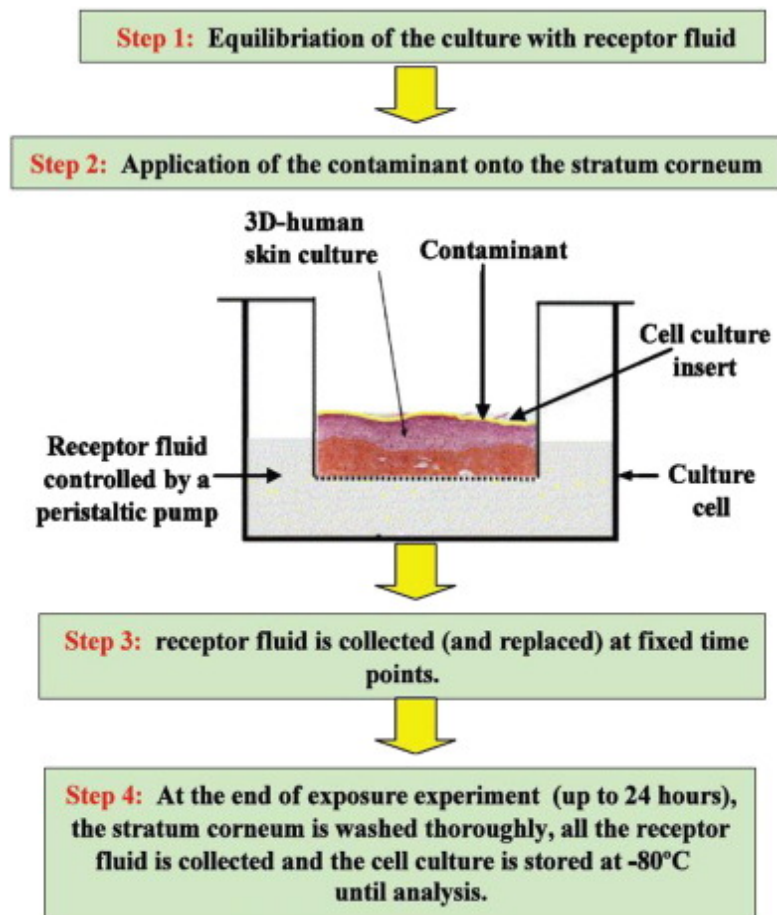


Figure 42 Etapes du test d'absorption cutané