Éthique en expérimentation animale : vers une évolution de la règle des 3R

Sylvie Huiban

▶ **To cite this version:**

Sylvie Huiban. Éthique en expérimentation animale : vers une évolution de la règle des 3R. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. dumas-03771743

HAL Id: dumas-03771743

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03771743

Submitted on 12 Sep 2022

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.

ANNEE 2022 THESE : 2022 – TOU 3 – 4001

ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE : VERS UNE EVOLUTION DE LA REGLE DES 3R

THESE
pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

par

HUIBAN Sylvie

Directrice de thèse : Mme Annabelle MEYNADIER

JURY

PRESIDENT :
M. Pierre PAYOUX Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEURES :
Mme Annabelle MEYNADIER Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Mme Nathalie BOURGES-ABELLA Professeure à l'Ecole Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
M. **DELVERDIER Maxence,** *Anatomie pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
M. **MEYER Gilles,** *Pathologie des ruminants*
M. **SCHELCHER François,** *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1ère CLASSE

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **DUCOS Alain**, *Zootechnie*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
M. **MAILLARD Renaud,** *Pathologie des ruminants*

PROFESSEURS 2ème CLASSE

Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
Mme **MEYNADIER Annabelle,** *Alimentation animale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*

Mise à jour le 01/10/2021

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
Mme **CAMUS Christelle***, Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PALIERNE Sophie***, Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain***, Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
Mme **BOUHSIRA Emilie***, Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
Mme **DANIELS Hélène***, Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure***, Hygiène et industrie des aliments*
M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude***, Physiologie*
Mme **GRANAT Fanny***, Biologie médicale animale*
Mme **JOURDAN Géraldine***, Anesthésie, analgésie*
M. **JOUSSERAND Nicolas***, Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **LALLEMAND Elodie***, Chirurgie des équidés*
Mme **LAVOUE Rachel***, Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume***, Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel***, Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MILA Hanna***, Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent,** *Pathologie de la reproduction*
M. **VERGNE Timothée***, Santé publique vétérinaire, maladies animales règlementées*
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

M. **AUMANN Marcel***, Urgences, soins intensifs*
M. **AUVRAY Frédéric***, Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
M. **CASSARD Hervé***, Pathologie des ruminants*
M. **CROVILLE Guillaume***, Virologie et génomique cliniques*
Mme **DEBREUQUE Maud***, Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **DIDIER Caroline***, Anesthésie, analgésie*
Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique***, Innovations thérapeutiques et résistances*
Mme **GAILLARD Elodie***, Urgences, soins intensifs*
Mme **GEFFRE Anne***, Biologie médicale animale et comparée*
Mme **GRISEZ Christelle***, Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **JEUNESSE Elisabeth***, Bonnes pratiques de laboratoire*
Mme **PRESSANTI Charline***, Dermatologie vétérinaire*
M. **RAMON PORTUGAL Félipe***, Innovations thérapeutiques et résistances*
M. **REYNOLDS Brice***, Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **ROUCH BUCK Pétra***, Médecine préventive*

Mise à jour le 01/10/2021

A NOTRE PRESIDENT DE THESE,

Monsieur le professeur Pierre Payoux

PU-PH Université de Toulouse

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de notre thèse.

Qu'il veuille bien accepter nos remerciements et hommages respectueux.

A NOTRE JURY DE THESE,

Madame le Docteur Annabelle Meynadier

Professeure de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Alimentation animale

Pour avoir accepté d'encadrer ce travail malgré les circonstances particulières de la demande, pour sa bienveillance et sa disponibilité,

Qu'elle veuille bien recevoir ici l'expression de nos remerciements et de notre respect le plus sincère.

Madame le Docteur Nathalie Bourges-Abella

Professeure de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Histologie, anatomie pathologique

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse, sincères remerciements.

A mon compagnon Hervé et à ma fille Elora qui m'ont encouragée et soutenue tout au long de ce travail,

A ma famille, pour son soutien moral,

A mes amis et collègues, toujours présents dans la joie ou la tourmente, physiquement ou moralement,

A ceux disparus, même s'ils ne sont plus là, ils restent dans mon cœur à jamais,

A Christine, dont l'aide a été si précieuse dans la rédaction de cette thèse et à nos parties de fou rire, grand merci,

A tous je suis et serai éternellement reconnaissante.

Table des matières

Introduction **p.7**

Partie I : Expérimentation animale et règle des 3R

A- L'expérimentation animale **p.8**

A-1 : Définition p.8

A-2 : Historique p.8

A-3 : Législation p.10

A-4 : L'expérimentation animale en chiffre p.11

A-4-1 : Espèces ou types d'animaux p.12

A-4-2 : Répartition selon l'utilisation p.15

A-4-3 : Répartition suivant la classe de sévérité des procédures p.16

A-4-4 : Au niveau européen p.18

B- La règle des 3R **p.20**

B-1 : Historique p.20

B-2 : Réduire p.21

B-2-1 : Optimisation des protocoles expérimentaux p.22

B-2-2 : Exploitation des données p.23

B-3 : Remplacer p.24

B-3-1 : Les méthodes alternatives/substitutives p.24

B-3-2 : Choix du modèle animal p.26

a- la mouche drosophile comme modèle p.27

b- le ver nématode comme modèle p.27
B-4 : Raffiner **p.28**
B-4-1 : Conditions de vie des animaux p.28
B-4-2 : Gestion de la douleur et points limites p.29
a-gestion de la douleur p.30
b-points-limites p.32
B-4-3 : L'euthanasie p.34

Partie II : alternatives à l'expérimentation animale

A-Généralités **p.38**
A-1 : Définition p.38
A-2 : Les raisons et enjeux p.38
A-3 : Validation d'une méthode alternative p.40
A-4 : Les différentes méthodes alternatives p.42
A-4-1 : Méthodes ex vivo p.42
A-4-2 : Méthodes in vitro p.43
A-4-3 : Méthodes in vivo p.44
A-4-4 : Méthodes in silico p.45
B- Les méthodes in vitro **p.45**
B-1 : Avantages et inconvénients p.45
B-2 : Les cultures cellulaires p.47
B-2-1 : Les cultures primaires p.47
B-2-2 : Les lignées cellulaires p.47
B-2-3 : Les cellules souches p.48
a-classement selon leur origine p.49

b-classement selon leur potentiel de différenciation p.50
B-3 : Les organoïdes p.52
C- Les méthodes in vivo **p.54**
C-1 : Intérêt de l'imagerie médicale p.55
C-2 : L'IRM p.55
C-3 : Le TEP, PET ou pet-scan p.57
C-4 : Imagerie par rayons X p.58
C-5 : Le scanner p.60
C-6 : L'échographie p.61
C-7 : La bioluminescence p.63
D- Les méthodes in silico **p.65**
D-1 : Les modèles informatiques p.65
D-2 : Applications p.67
D-3 : Limites des méthodes in silico p.67
E- Les organes sur puce **p.68**
E-1 : Définition p.68
E-2 : Historique p.69
E-3 : Applications p.70
E-4 : Les limites des organes sur puce p.71

Partie III : Vers un 4ème et un 5ème R, réhabilitation/réutilisation et responsabilisation/respect

A- La réhabilitation **p.72**

A-1 : Définition p.72

A-2 : Législation p.72

A-3 : Les enjeux p.73

A-4 : Mise en place p.74

A-4-1 : Quels animaux ? p.74

A-4-2 : Quels laboratoires ? p.76

A-4-3 : Quel coût ? p.77

A-5 : Le GRAAL p.77

A-5-1 : Présentation p.77

A-5-2 : Processus de réhabilitation en partenariat avec le GRAAL p.79

A-5-2-1 : contrat de cession p.79

A-5-2-2 : L'accueil des animaux p.80

a-transport p.80

b- l'accueil provisoire p.80

c- le choix des adoptants p.81

d- suivi des adoptions p.82

A-5-3 : Bilan des réhabilitations p.84

A-5-4 : Cas particulier des primates p.85

A-6 : Autres associations p.85

A-6-1 : White Rabbit p.85

A-6-2 : Ethosph'R p.86

B- La réutilisation **p.87**

B-1 : Cadre légal p.87

B-2 : Les animaux réutilisés p.88

B-2-1 : selon l'espèce p.88

B-2-2 : selon le protocole p.92

C- La responsabilisation **p.94**

C-1 : Qu'est-ce que la responsabilisation p.94

C-2 : Formation du personnel p.95

C-2-1 : formation initiale et formation spécifique p.96

C-2-2 : formation continue p.99

C-2-3 : la validation des compétences p.100

C-3 : Demande d'autorisation d'un protocole p.100

C-3-1 : Les instances aptes à procéder aux évaluations p.101

C-3-2 : Les principes d'une procédure efficace p.102

C3-3 : Exemple d'une demande d'autorisation de procédure p.103

C-4 Les comités d'éthique en expérimentation animale p.105

C-4-1 : Intérêt et législation p.105

C-4-2 : Rôle des comités d'éthique en expérimentation animale (CEEA) p.106

C-4-3 : Fonctionnement des comités d'éthique p.107

C-5 : Les structures de bien-être animal (SBEA) p.107

C-5-1 : Le bien-être animal p.107

C-5-2 : cadre légal p.108

C-5-3 : Structure et rôle p.109

a-structure p.109

b-rôle de la SBEA p.110

C5-4 : Les comités nationaux p.111

Conclusion p.112

Annexes p.113

Annexe I : différentes lignées cellulaires p.113

Annexe II : Classification des expériences sur animaux selon leur degré de gravité (catégories de contrainte) p.114

Annexe III : documents de traçabilité p.115
Annexe IIIa : fiche individuelle de traçabilité p.115
Annexe IIIb : certificat de bonne santé p.116
Annexe IIIc : Document de cession p.117

Annexe IV : Les statuts sanitaires des animaleries p.118

Annexe V: exemples de grille de score p.120
Annexe Va-grille de score générale p.120
Annexe Vb : grille de score adaptée p.121

Annexe VI : les formations spécifiques en expérimentation animale p.122

Annexe VII : les missions des SBEA et CEEA p.123

Liste des abréviations p.124

Liste des figures p.125

Liste des tableaux p.127

Bibliographie p.128

Introduction

Depuis toujours, l'expérimentation animale a été au cœur de débats houleux. Si sa légitimité n'est pas remise en cause, le recours trop fréquent à celle-ci et le sort réservé aux animaux de laboratoire posent problème.

L'utilisation d'un sujet expérimental vivant, doté d'un système nerveux donc doué de sensibilité, pose la question de la validité de l'expérimentation et la légitimité d'utiliser un être vivant (LETOURNEAU, 2005) (1). Ce sujet n'est pas nouveau, déjà au XVIIe siècle on commençait à évoquer la compassion envers les animaux (BURGAT F, 2002) (2). Au XIXe siècle, Hall, physiologiste anglais (1790-1857), proposait une règlementation sur les expérimentations de physiologie, vivisections à ce moment-là, en tenant compte de la souffrance animale.

De nos jours, l'animal est reconnu comme étant doué de sensibilité à son environnement et aux contraintes appliquées. La société actuelle n'accepte plus la souffrance animale et des groupes tels la SPA, la Fondation Brigitte Bardot sont à l'origine de pétitions (stop vivisection plus de 1 million de signatures) qui ont fait évoluer la reconnaissance de l'animal en expérimentation animale.

Ce que nous nous proposons de voir ici c'est comment on peut, au stade actuel des connaissances, améliorer le sort de ces animaux de laboratoire en respectant la règle des 3 R, comment les remplacer par des techniques alternatives et son évolution possible vers une règle des 4 voire 5 R.

PARTIE I : Expérimentation animale et règle des 3 R.

A-L 'expérimentation animale

A-1 : Définition

L'expérimentation animale se définit comme étant l'ensemble des procédures qui visent à mieux comprendre le fonctionnement des organismes vivants. Elle permet d'analyser le fonctionnement des systèmes biologiques du règne animal et ce à partir d'observations sur du matériel vivant. Comprendre la physiologie permet de comprendre le mode de développement de certaines maladies (cancers, maladies infectieuses...) et donc de faire progresser la recherche médicale, le développement de techniques chirurgicales et de médicaments.

Le but recherché est l'amélioration de la qualité et de la durée de vie humaine mais aussi animale. Il faut également souligner l'importance de la recherche expérimentale qui permet d'orienter et de cibler la recherche appliquée (DIGART JP, « le temps des sciences »,1990) (3).

A-2 : Historique

L'utilisation de l'animal par l'homme relève de considérations philosophiques qui déniaient une conscience et donc une âme à l'animal. Aristote (384-322 avant J.C) reconnaissait à l'animal une âme végétative et sensitive alors que l'homme, lui, était doté d'une âme intellective (AUTISSIER. C, avril 2008) (4).

Les premières expérimentations furent menées par Galien (130-200 après J.C), pour appuyer ses démonstrations en physiologie et anatomie : montrer, par exemple, que les artères contiennent du sang et non de l'air comme il était coutume de le croire en ce temps-là. Jusqu'au XVème siècle, Hippocrate, Aristote et Galien restent les seules références dans

l'enseignement de la médecine, et c'est à partir de la renaissance que les dissections réapparaissent avec les travaux d'Andréas Vesalius (1514-1564).

Descartes lui- même, dans son discours sur la séparation du corps et de l'esprit, décrivait l'animal comme « une machine, certes complexe mais qui n'a ni conscience ni sensation. Les douleurs qu'il ressent ne sont donc que des disfonctionnements de la machine ».

Ce n'est qu'à partir du XVIIIème siècle que les consciences évoluent notamment grâce à Marshall Hall (1790-1857), physiologiste anglais qui préconise de réglementer les procédures utilisées sur les animaux afin de préserver leur bien-être et à la théorie de Darwin (1809-1882) qui prouve la continuité entre l'animal et l'homme. Néanmoins, certains physiologistes et médecins s'octroient le droit d'expérimenter sur l'animal, sous anesthésie toutefois, tel Claude Bernard qui déclarait en 1865 : « *a-t-on le droit de faire des expériences et des vivisections sur les animaux ? Quant-à moi, je pense qu'on a ce droit d'une manière entière et absolue […] dès qu'elles peuvent être utiles pour l'homme. ».*

En 1949, le code de Nuremberg dans son article 3 mentionne qu'une expérimentation ne peut être menée sur l'homme que si les résultats d'expériences menées sur les animaux sont probants.

Jusqu'au début des années 1980, les animaux étaient exclus du domaine de l'éthique, ils n'étaient que des machines biologiques dépourvus de toute sensibilité, mus par des instincts innés. En 1990, le philosophe australien Peter Singer (1946), reconnu comme « Le Père du mouvement pour les droits des animaux », a émis l'hypothèse selon laquelle tout être capable de souffrance mérite de la considération, et pour lui une expérience peut se justifier si la somme des souffrances subies par l'animal est inférieure au bénéfice escompté. Cela pose les fondements de la licéité d'une expérimentation sur les animaux.

La prise de conscience de la sensibilité animale par la société dans son ensemble, la croissance exponentielle des animaux de compagnie, l'animal passant d'un statut utilitaire à un statut de membre de la famille, ont poussé les autorités à évoluer pour protéger l'animal d'expérimentation et à considérer son bien-être. Toutefois, toutes les espèces ne bénéficient pas de la même protection. En effet, les lois ne protègent que les animaux vertébrés ainsi que leurs formes larvaires ou fœtales à différents stades de développement, et depuis peu, les céphalopodes mais pas les insectes.

A-3 : Législation

La première loi en matière de protection animale a vu le jour en France le 25 juillet 1791, l'animal est protégé mais en tant que propriété. Elle sera suivie par la loi Grammont, votée en 1850 qui promulgue la protection animale contre les mauvais traitements en public, mais elle relève plus du domaine contraventionnel que de la véritable protection animale et concerne surtout la maltraitance des chevaux par leur cocher.

Ce n'est qu'en 1976 qu'apparaît une loi octroyant à l'animal un statut « d'être sensible » et non plus « d'objet » (loi n°76-629, du 10 juillet 1976, JO 13/07/76,4203-6).

La première loi intéressant spécifiquement l'animal de laboratoire apparaît quant à elle en 1985. Il s'agit de la « convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou d'autres fins scientifiques » (conseil de l'Europe, 20 septembre 1985). Elle sera suivie d'une directive donnant la ligne de conduite à suivre pour traduire cette loi en droit national (CEE 86-609, annexes I et II).

Cela a abouti, en France, au décret 87-848 du 19 octobre 1987 et à ses arrêtés d'application qui règlementent :

-la fourniture des animaux aux laboratoires agréés,

-les conditions d'attribution des autorisations d'expérimentation sur des animaux,

-les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements d'expérimentation animale (EEA).

Ce texte sera complété par le décret 2001-464 du 29 mai 2001(5), précisant les champs d'action de l'expérimentation animale, et qui responsabilise le chercheur : autorisation de protocole, formation spécifique, recours à l'anesthésie pour les interventions douloureuses...

La règlementation actuellement en vigueur en France (art R 214-87 à R 214-137 du code rural) a été mise à jour par le décret 2013-118 et cinq arrêtés, en date du 1er février 2013 et publiés le 7 février 2013, en application de la directive européenne 2010/63/UE et est sous la responsabilité du ministère de l'agriculture. Elle établit les règles suivantes :

- La règlementation protège les animaux vertébrés, leurs formes larvaires ou fœtales évoluées et les céphalopodes. Sont donc concernés les mammifères, poissons, oiseaux mais pas les insectes. L'usage des primates non humains est restreint et celui des grands singes est interdit.
- Les animaux doivent provenir d'élevages ou de fournisseurs agréés. Les animaux d'espèces domestiques errants ne peuvent pas être utilisés sauf exigence sanitaire particulière et sur dérogation.
- Une expérience sur animaux n'est licite que si elle est nécessaire et irremplaçable et que si elle relève de la recherche en santé humaine ou animale, de la protection de l'environnement ou de l'enseignement supérieur ou professionnel ou d'enquêtes médico-légales. Les principes de remplacement (par une méthode ne nécessitant pas

d'animaux), de réduction (par la diminution du nombre d'animaux au strict minimum) et de raffinement (par le choix des méthodes les plus douces) doivent être respectés.

- Les expériences douloureuses doivent être pratiquées sous anesthésie sauf dérogation documentée. La mort comme donnée d'observation de l'expérience, doit être évitée autant que possible.
- Tout établissement éleveur, fournisseur ou utilisateur doit être agréé (conformité des installations et de la formation du personnel). L'agrément est accordé pour 6 ans. Un vétérinaire et une structure du bien-être des animaux (SBEA) doivent être désignés. Des inspections régulières sont réalisées.
- Une commission nationale de l'expérimentation animale composée de 20 membres (ministères, recherche publique et privée, associations de protection animale, professionnels de la recherche) donne des avis et fait des propositions.
- Un comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale établit le bilan annuel national d'activité des comités d'éthique et formule des recommandations. Il est composé de 14 membres (ministères, professionnels, médecin, vétérinaire, philosophe, juriste, sociologue, associations de protection animale).

Cette directive européenne est complétée par la « charte portant sur l'éthique de l'expérimentation animale », qui prône le respect de l'animal et le recours aux méthodes ou techniques qui visent à réduire au maximum les atteintes aux animaux et donc l'application de la règle des 3R, et la mise en place des comités d'éthique. Elle propose surtout aux chercheurs d'adopter une démarche éthique dans leurs pratiques.

A-4 : L'expérimentation animale en chiffre

Les données chiffrées dont on dispose, proviennent de l'enquête statistique de 2018 sur l'utilisation des animaux à des fins scientifiques (vertébrés et céphalopodes), sous responsabilité du ministère de l'enseignement supérieur et de l'innovation. L'enquête annuelle repose sur les données transmises par l'ensemble des établissements utilisant des animaux à des fins scientifiques, au titre de l'année 2018. Les données sont formatées selon le standard de la commission européenne.

En dehors des céphalopodes, sont exclus de l'enquête les invertébrés comme par exemple la mouche drosophile ou les vers nématodes qui sont tout de même des modèles importants pour la recherche. Cette enquête comptabilise les animaux sortis de procédure au cours de l'année 2018. Si un animal a été utilisé plusieurs fois, il sera comptabilisé autant de fois que de procédures.

Cette enquête n'inclut pas non plus les animaux utilisés hors procédure :

-les animaux élevés dans les établissements pour générer des animaux expérimentaux, y compris des animaux génétiquement altérés mais sans phénotype dommageable,

-les animaux euthanasiés, selon des méthodes réglementaires, pour prélèvement d'organes ou de tissus,

-les essais cliniques vétérinaires pour l'obtention des AMM,

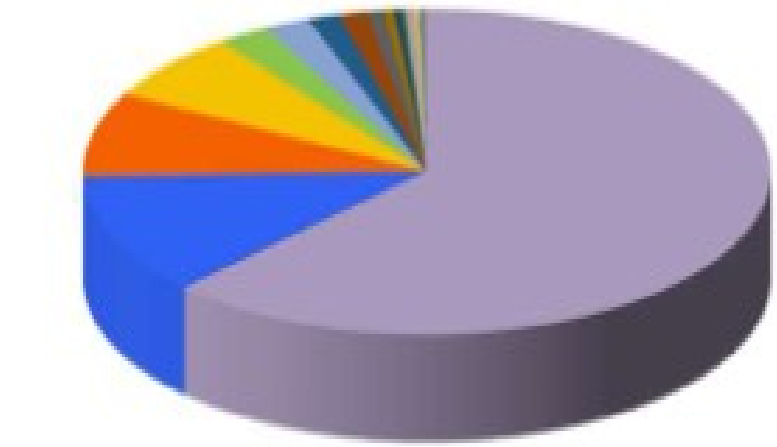
-les essais hors Union Européenne.

A-4-1 : <u>Espèces ou types d'animaux</u>

Au total, c'est 1 910 519 animaux utilisés, chiffre en augmentation par rapport à l'année 2014 (1 769 618), mais stable par rapport à 2015, 2016 et 2017.

Les souris sont les plus utilisées (62%), puis viennent les poissons (13%), les rats (8%), les lapins (7%). Les primates non humains représentent 0,18%, les chiens 0,22% et les chats 0,06%.

L'enquête statistique de l'année 2018 nous donne la répartition suivante :



- [A1] Souris (Mus musculus)
- [A35] Autres poissons
- [A2] Rats (Rattus norvegicus)
- [A8] Lapins (Oryctolagus cuniculus)
- [A28] Poules, coqs et poulets (Gallus gallus domesticus)
- [A3] Cochons d'Inde (Cavia porcellus
- [A29] Autres oiseaux
- [A34] Poissons zébres (Danio rerio)
- [A14] Porcs (Sus scrofa domesticus)
- Autres animaux (2,0%)

Espèces	Nombre total d'animaux	Pourcentage (%)
[A1] Souris (Mus musculus)	1 192 548	62
[A35] Autres poissons	231 760	12
[A2] Rats (Rattus norvegicus)	159 786	8
[A8] Lapins (Oryctolagus cuniculus)	131 587	7
[A28] Poules, coqs et poulets (Gallus gallus domesticus)	46 029	2
[A3] Cochons d'Inde (Cavia porcellus)	41 727	2
[A29] Autres oiseaux	29 095	2
[A34] Poissons zébres (Danio rerio)	25 127	1
[A14] Porcs (Sus scrofa domesticus)	14 969	1
[A32] Xénopes (Xenopus laevis et Xenopus tropicalis)	9 289	
[A4] Hamsters dorés (Mesocricetus auratus)	5 193	
[A16] Moutons (Ovis aries)	4 304	
[A10] Chiens (Canis familiaris)	4 219	
[A20] Macaques cynomolgus (Macaca fascicularis)	3 009	
[A7] Autres rongeurs	2 913	
[A17] Bovins (Bos primigenius)	2 256	
[A30] Reptiles	2 120	
[A9] Chats (Felis catus)	1 185	
[A15] Chèvres (Capra aegagrus hircus)	710	
[A6] Gerbilles de Mongolie (Meriones unguiculatus)	596	
[A13] Chevaux, ânes et croisements (Equidés)	482	
[A33] Autres amphibiens	458	
[A31] Grenouilles (Rana temporaria et Rana pipiens)	256	
[A36] Céphalopodes	219	
[A19] Ouistitis, Marmosets et tamarins	206	
[A18] Prosimiens	159	
[A27] Autres mammifères	104	
[A21] Macaques rhesus (Macaca mulatta)	62	
[A23] Babouins (Papio spp.)	36	
[A12] Autres carnivores	29	
[A11] Furets (Mustela putorius furo)	28	
[A25-1] Autres espèces de singes de l'ancien monde	22	
[A5] Hamsters de Chine (Cricetulus griseus)	20	
[A22] Singes vervet (ex. Chlorocebus sabaeus)	16	
Total général	**1 910 519**	

Fig. 1 : utilisation des animaux en expérimentation animale, répartition selon les espèces (enquête statistique 2018 du ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation)

Les animaux utilisés sont majoritairement nés dans l'Union Européenne (95%), les 5 % qui ne proviennent pas de l'Union Européenne sont par exemple des lignées de souris transgéniques en provenance des USA. Ceux qui ne proviennent pas d'établissements

éleveurs ou fournisseurs agréés sont des animaux élevés au sein même de l'établissement utilisateur. Les animaux issus de la réutilisation représentent 2,2 % du total.

A-4-2 : Répartition selon l'utilisation

La recherche fondamentale reste le domaine où l'on utilise le plus d'animaux (36%), puis viennent :

- les recherches appliquées sur les pathologies humaines, animales ou végétales (28%),

- la mise au point, la production ou les essais de qualité et d'innocuité de médicaments ou d'aliments (27%),

- la maintenance de colonies d'animaux génétiquement modifiés à phénotype dommageable (4%),

- l'enseignement ou la formation (2%),

-la recherche en vue de la conservation des espèces (2%),

-les enquêtes médico-légales et la protection de l'environnement (1%).

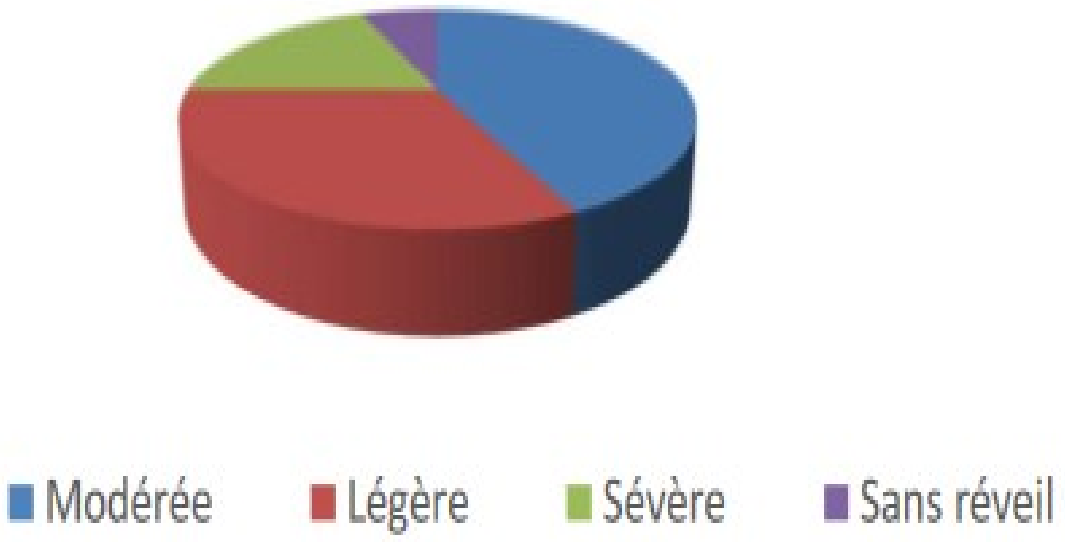
Si on compare la répartition des utilisations par rapport à l'année 2014, le pourcentage dédié à la mise au point des médicaments a été divisé par 2 (52% en 2014). On peut en attribuer le bénéfice entre autre à la loi interdisant l'utilisation de tests sur les animaux en cosmétologie (directive européenne76/74/CEE, 7ème amendement 2003/15/CEE), pour les produits fabriqués en Europe.

Enfin, 27% des utilisations d'animaux visent à satisfaire des obligations législatives ou réglementaires. Ce sont des obligations d'origine européenne dans 97% des cas. La grande majorité de ces utilisations (83%) est liée à la validation de médicaments, à usage humain ou vétérinaire, y compris les vaccins.

En particulier, les deux tiers des expérimentations avec des chats (863 sur 1185) concernent la validation de produits à usage vétérinaire. Vient ensuite la mise au point d'appareils médicaux, comme les prothèses (9% des utilisations). Le contrôle des produits de l'industrie chimique représente 3% des utilisations d'animaux. L'utilisation d'animaux pour le contrôle des produits alimentaires (incluant les matériaux d'emballage et la sécurité des personnes, des animaux et de l'environnement) et phytosanitaires comptent pour 1% et 0,8% respectivement.

A-4-3 : <u>Répartition suivant la classe de sévérité des procédures</u>

Toutes espèces confondues, les procédures les moins contraignantes, c'est-à-dire de classe modérée ou légère, sont les plus nombreuses (75% en tout). Les procédures de classe sévère concernent un peu moins de 19 % des utilisations d'animaux, et les procédures « sans réveil », 6% d'entre elles. Les animaux inclus dans des procédures sévères sont essentiellement des souris (70 %), des poissons (19%) et des rats (7%).



Espèces	Modérée	Légère	Sévère	Sans réveil
[A1] Souris (Mus musculus)	562 192	306 539	249 006	74 811
[A8] Lapins (Oryctolagus cuniculus)	88 357	34 767	7 311	1 152
[A2] Rats (Rattus norvegicus)	57 496	52 976	25 277	24 037
[A3] Cochons d'Inde (Cavia porcellus)	32 913	6 256	1 478	1 080
[A29] Autres oiseaux	23 295	3 490	70	2 240
[A28] Poules, coqs et poulets (Gallus gallus domesticus)	19 887	23 008	1 751	1 383
[A35] Autres poissons	17 014	138 566	67 311	8 869
[A34] Poissons zèbres (Danio rerio)	8 631	13 403	1 726	1 367
[A14] Porcs (Sus scrofa domesticus)	4 941	5 643	785	3 600
[A32] Xénopes (Xenopus laevis et Xenopus tropicalis)	1 507	7 313	96	373
[A10] Chiens (Canis familiaris)	1 482	2 394	141	202
[A16] Moutons (Ovis aries)	1 354	2 359	404	187
[A4] Hamsters dorés (Mesocricetus auratus)	760	2 818	1 495	120
[A7] Autres rongeurs	720	1 873	8	312
[A20] Macaques cynomolgus (Macaca fascicularis)	664	2 045	269	31
[A9] Chats (Felis catus)	426	750	5	4
[A15] Chèvres (Capra aegagrus hircus)	325	290	2	93
[A6] Gerbilles de Mongolie (Meriones unguiculatus)	306	20	164	106
[A17] Bovins (Bos primigenius)	225	1 987	34	10
[A18] Prosimiens	129	20	10	
[A13] Chevaux, ânes et croisements (Equidés)	56	415	6	5
[A21] Macaques rhesus (Macaca mulatta)	30	25	4	3
[A11] Furets (Mustela putorius furo)	22	6		
[A12] Autres carnivores	12	7		10
[A23] Babouins (Papio spp.)	10	24		2
[A25-1] Autres espèces de singes de l'ancien monde	10	12		
[A30] Reptiles	10	2 110		
[A27] Autres mammifères	9	91		4
[A19] Ouistitis, Marmosets et tamarins	7	164		35
[A22] Singes vervet (ex. Chlorocebus sabaeus)	4	5		7
[A31] Grenouilles (Rana temporaria et Rana pipiens)		167		89
[A33] Autres amphibiens		325		133
[A36] Céphalopodes		219		
[A5] Hamsters de Chine (Cricetulus griseus)		20		
Total général	**822 794**	**610 107**	**357 353**	**120 265**
Pourcentage (%)	**43,1**	**31,9**	**18,7**	**6,3**

Fig 2 : répartition des espèces suivant la classe de sévérité des procédures (enquête statistique 2018 du ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation)

On peut retrouver la classification des classes de sévérité des procédures en annexe II.

A-4-4 : <u>Au niveau européen</u>

Les chiffres au niveau européen ont été publiés en 2019 et couvrent une période de 2 ans, entre 2015 et 2017 (2019 report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union in 2015-2017). Cette enquête englobe les données transmises par les 28 états membres, traitées selon une méthode standardisée et ayant les mêmes restrictions que pour l'enquête française (animaux concernés, stade d'évolution...).

Le nombre total d'animaux utilisés au niveau européen est de :

- 9 782 570 en 2015
- 10 028 498 en 2016
- 9 581 741 en 2017.

Le nombre d'animaux utilisés était de 11,5 millions en 2011.

La recherche fondamentale en utilise 49%, la recherche appliquée 23%, les obligations règlementaires 23%.

Le pourcentage d'animaux réutilisés varie suivant l'espèce utilisée comme le montre le tableau ci-après.

Espèces	Réutilisés	Total	Pourcentage de réutilsation pour chaque espèce
[A1] Souris (Mus musculus)	15 674	1 131 723	1,3
[A30] Reptiles	5 933	6 151	96,4
[A2] Rats (Rattus norvegicus)	4 634	166 245	2,7
[A10] Chiens (Canis familiaris)	1 877	4 898	38,3
[A32] Xénopes (Xenopus laevis and Xenopus tropicalis)	1 727	5 677	30,4
[A8] Lapins (Oryctolagus cuniculus)	1 551	135 608	1,1
[A20] Macaques cynomolgus (Macaca fascicularis)	1 081	2 923	36,9
[A16] Moutons (Ovis aries)	949	4 895	19,3
[A17] Bovins (Bos primigenius)	712	2 195	32,4
[A15] Chèvres (Capra aegagrus hircus)	695	807	86,1
[A13] Chevaux, ânes et croisements (Equidés)	607	695	87,3
[A9] Chats (Felis catus)	559	1 007	55,5
[A28] Poules, coqs et poulets (Gallus gallus domesticus)	321	76 624	0,4
[A33] Autres amphibiens	320	573	55,8
[A35] Autres poissons	297	177 188	0,1
[A7] Autres rongeurs	208	1 582	13,1
[A29] Autres oiseaux	193	37 982	0,5
[A14] Porcs (Sus scrofa domesticus)	125	12 617	0,9
[A19] Ouistitis, Marmosets et tamarins	122	172	70,9
[A34] Poissons zèbres (Danio rerio)	79	51 108	0,1
[A3] Cochons d'Inde (Cavia porcellus)	63	37 423	0,1
[A21] Macaques rhesus (Macaca mulatta)	41	63	65
[A36] Céphalopodes	22	96	22,9
[A25-1] Autres espèces de singes de l'ancien monde	18	20	90,0
[A4] Hamsters dorés (Mesocricetus auratus)	5	5 912	
[A22] Singes vervet (ex. Chlorocebus sabaeus)	3	28	10,7
[A11] Furets (Mustela putorius furo)		150	
[A12] Autres carnivores		24	
[A18] Prosimiens		109	
[A23] Babouins (Papio spp.)		24	
[A27] Autres mammifères		179	
[A31] Grenouilles (Rana temporaria and Rana pipiens)		260	
[A5] Hamsters de Chine (Cricetulus griseus)		17	
[A6] Gerbilles de Mongolie (Meriones unguiculatus)		428	
Total général	**37 816**	**1 865 403**	

Fig.3 : réutilisation des animaux suivant l'espèce (enquête statistique 2019 du ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation).

Comme on peut le constater, les données chiffrées évoluent de manière similaire tant au niveau français qu'européen. La France se place à la troisième position en matière d'utilisation d'animaux derrière la Grande-Bretagne et l'Allemagne (source : enquête de la commission européenne). La Grande-Bretagne, au moment des enquêtes faisait encore partie de l'Union Européenne.

Il est à noter que les chiffres sont stables depuis l'entrée en vigueur de la directive européenne 2010/63/UE pour deux raisons : les autorisations de protocoles expérimentaux

utilisant des animaux à des fins scientifiques sont délivrées pour une certaine durée (maximum 5ans) et la dernière enquête statistique a eu lieu en 2018 sur une compilation des données enregistrées en 2017. La légère tendance à la baisse devrait être confirmée par une enquête statistique plus récente. Cependant, la pandémie due au virus de la Covid aura probablement un impact sur ces chiffres dont on ignore encore la portée.

Dans l'objectif de rationaliser l'utilisation des animaux en science, la France continue de promouvoir très activement le principe de la règle des 3R, à travers la procédure d'autorisation de projet en place depuis 2013.

Elle peut s'appuyer sur l'expertise de ses comités d'éthique en expérimentation animale, répartis sur tout le territoire national. Ils contribuent tous, localement, à approfondir la réflexion éthique des techniciens et des chercheurs,à les sensibiliser aux principes de réduction, remplacement et raffinement et à promouvoir le partage des meilleures pratiques dont le recours aux méthodes alternatives ou substitutives.

B- La règle des 3R

B-1 : Historique

La défense du bien-être animal n'a pu voir le jour qu'à partir du moment où on a commencé à considérer les animaux autrement que comme des machines sans âme, tel le philosophe allemand Schopenhauer (1788-1860) qui dénonça la vivisection et appela au respect de l'animal.

Marshall Hall, dès 1831, en Grande-Bretagne, préconise de règlementer les procédures expérimentales utilisées, de les perfectionner afin d'améliorer le bien-être animal. Ce principe a été repris et élargi par deux biologistes anglais, William Russel et Rex Burch dans leur ouvrage publié en 1959 : « the Principles of Human Experimental Technique » : « une science sans cruauté est une bonne science et le meilleur moyen d'atteindre ce but est l'application rigoureuse des 3R »(6).

Après avoir gradué les souffrances subies par les animaux en expérimentation dans les laboratoires anglais, W.M.S. Russell et R.L. Burch ont développé un programme de mise en place et de développement de lignes directrices dites « humaines » , comprenant les points suivants :

- **Reduce :** réduire le nombre d'animaux en expérimentation,
- **Refine :** raffiner la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points"),
- **Replace :** remplacer les modèles animaux.

Ce concept a été progressivement adopté par diverses institutions pour fixer des lignes de conduite pour l'expérimentation animale : le Conseil Canadien de Protection des Animaux, le Département américain chargé de l'agriculture (Animal Welfare Act), et le gouvernement britannique (Home Office).

Il a été introduit dans la réglementation par :

- le Conseil de l'Europe (convention STE N° 123),
- l'Union européenne (directive n° 2010/63/UE),
- et la France (décret n° 2013-118 ; les arrêtés du 1er février 2013) : 10 mesures visant à mettre en place une véritable politique de l'expérimentation animale dans les organismes publics de recherche (décret n° 2001-464 ; décret n° 2001-486). (7)

Cette règle constitue le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en Europe et Amérique du Nord.

B-2 : Réduire

L'objectif de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale peut être atteint en optimisant les protocoles, en exploitant au maximum les données obtenues lors des recherches et en permettant un partage des données, via une plateforme dédiée par exemple. (M.F.W. Festing) (8). Cela entre dans une démarche certes règlementaire mais aussi éthique et économique.

B-2-1 : Optimisation des protocoles expérimentaux

Seules les expérimentations jugées comme absolument indispensables doivent être autorisées. Il convient d'éviter la répétition d'études antérieures qui auraient pu être réalisées dans un autre pays et destinées à répondre à des exigences législatives/réglementaires nationales ou communautaires (directive n° 86/609/CEE) en vue d'une autorisation de mise sur le marché ou d'une vérification d'innocuité/toxicité.

Le nombre d'animaux à utiliser pour un protocole expérimental doit être calculé au plus juste lors de la demande d'autorisation dudit protocole. Une estimation préalable doit absolument être effectuée pour déterminer le nombre d'animaux à utiliser.

Il est du ressort d'un comité d'éthique de proposer des améliorations aux protocoles expérimentaux dont les objectifs ne sont pas clairs, les procédures insuffisamment détaillées, les modèles animaux inadaptés ou le nombre d'animaux inadéquat, et de rejeter le protocole si le demandeur n'accepte pas d'appliquer les améliorations demandées.

Dans certaines études, le contrôle des variétés physiologiques par des méthodes d'élevage appropriées et une gestion de l'environnement dans lequel les animaux sont placés, permet d'obtenir des animaux plus uniformes. En limitant la variabilité due aux différences liées aux individus (sexe, âge, variation de poids, état sanitaire...) on obtient des résultats plus cohérents sur un nombre plus réduit d'individus, représentatifs de la population étudiée.

Le recours à l'imagerie médicale permet également de diminuer le nombre d'individus impliqués dans un protocole. En effet, ces méthodes peu invasives ne nécessitent pas de sacrifice du sujet, celui-ci peut être étudié dans la durée pour suivre une évolution ou être utilisé pour plusieurs études en tenant compte de la classe de gravité de la procédure engagée. Nous étudierons ces différentes technologies dans la seconde partie.

Le partage d'animaux entre collègues menant des travaux de recherche, soit voisins mais avec des techniques différentes, soit différents mais compatibles entre eux doit être privilégié.

La standardisation des protocoles et leur reproductibilité permet également une diminution du nombre d'animaux impliqués.

En toxicologie, l'abandon du dosage obligatoire de la DL50 a été une avancée remarquable en matière d'économie d'animaux. La détermination de la DL50 permet d'étudier la toxicité aigüe d'un produit. Cela consiste à administrer en une fois des doses croissantes du produit à tester, la DL50 étant la dose qui provoque la mort de la moitié de la population étudiée. Ce dosage de la DL50 n'est plus obligatoire depuis 1991. On se sert maintenant d'outils statistiques pour la déterminer, en travaillant sur un nombre minime d'animaux.

Mais il ne faut pas oublier que réduire le nombre d'animaux ne doit pas se faire aux dépens des résultats, le but est d'obtenir des résultats exploitables avec le plus petit nombre d'animaux.

B-2-2 : exploitation des données

Afin d'éviter une répétition d'expériences dans un domaine de recherche similaire, les scientifiques doivent pouvoir disposer d'une « banque de données ».

C'est sur cette base qu'a été établi le rapport REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) (9) pour les substances chimiques grâce au principe OSOR (One Substance One Registration) ou principe de la soumission conjointe : les industriels ont l'obligation de partager leurs informations non confidentielles au sujet d'une substance et d'utiliser les données préexistantes afin d'éviter les expérimentations animales redondantes.

REACH est un règlement de l'Union européenne adopté pour mieux protéger la santé humaine et l'environnement contre les risques liés aux substances chimiques, tout en favorisant la compétitivité de l'industrie chimique de l'UE. Il promeut également des méthodes alternatives pour l'évaluation des dangers des substances afin de réduire le nombre d'essais sur les animaux.

Ce règlement s'applique à toutes les substances chimiques. Il est entré en vigueur le 1er juin 2007. « Les états membres de l'Union Européenne devront prendre en compte et accepter les données d'un autre état membre si ces données ont été générées au moyen de procédures qui sont reconnues par la législation de l'Union » (art.46).

Ce règlement définit un système de partage des données sur la base d'un forum d'échange, sous contrôle de l'ECHA (European CHemical Agency) qui :

-permet de créer une base de données commune,

-pose le principe de mutualisation des résultats entre les entreprises produisant les mêmes substances.

Lorsque ces données sont couvertes par la propriété industrielle, les entreprises doivent en acquérir les droits.

Ce transfert des données permet de diminuer le nombre d'essais nécessaires et donc de réduire le coût d'enregistrement d'une substance et de valoriser les études déjà réalisées. Si aucune donnée préalable n'est disponible, l'entreprise doit déposer une demande auprès de l'ECHA pour que celle-ci autorise un test d'évaluation. REACH incite à utiliser des tests économiques en animaux et le recours aux méthodes alternatives (extrapolation par cumul d'effets pour les mélanges, screening pour l'écotoxicologie).

Il existe des bases de données ouvertes type QSAR et des bases payantes. Le risque pour les industriels est l'accès des données européennes à des concurrents non européens sans réciprocité.

Pour les recherches ne concernant pas l'industrie chimique (ex recherche fondamentale) le partage et la valorisation des données issues des études sur l'animal repose sur des accords volontaires.

Les résultats des recherches menées par les scientifiques font l'objet de publications dans des revues spécialisées et sont consultables par l'ensemble de la communauté

scientifique. Or ces revues ne publient pas les résultats dits négatifs. Qu'est-ce qu'un résultat négatif ? Dans le domaine industriel, on parle de résultat négatif quand l'étude n'a pas donné de résultat digne d'intérêt ou parce que l'étude a montré qu'une réaction négative s'est produite. Pour le monde académique, une expérience est un échec quand elle n'a abouti à aucun résultat intéressant ou quand la voie suivie était fausse parce que la procédure a démontré que le système n'opérait pas conformément à l'hypothèse de départ. La publication de résultat négatif impacterait la réputation du chercheur et risquerait de compromettre des financements d'études à venir. Mais depuis peu, ces résultats négatifs sont consultables sur des open source (sites de libre distribution des données).

« Le partage des résultats non destinés à être publiés, dits résultats négatifs, devrait être encouragé, comme le proposait déjà l'OPECST en 2009. » (Extrait du rapport de l'assemblée nationale, 17 janvier 2009) (10).

Toutefois, des efforts sont faits ces dernières années pour partager les données tant chez les industriels que dans la communauté scientifique.

B-3 : Remplacer

Le principe du remplacement consiste à :

- substituer une espèce sensible par une autre, jugée moins sensible (utilisation d'invertébrés au lieu d'un mammifère par exemple) à condition que le modèle choisi reste prédictif pour l'objectif de l'étude,

- remplacer chaque fois que c'est possible le modèle in vivo par des méthodes ex vivo, in vitro ou in silico (dites méthodes alternatives ou substitutives).

B-3-1 : les méthodes alternatives/substitutives

Dans la règlementation, une méthode est dite alternative quand elle permet d'améliorer, réduire ou supprimer l'emploi d'animaux. Une méthode alternative qui supprime complètement l'emploi d'animaux est dite substitutive.

Une méthode alternative peut être applicable dans de nombreux domaines, en particulier dans les études de sécurité au sens large, à condition que le modèle utilisé ait été dûment validé et soit utilisé dans le champ d'application de sa validation.

La liste des méthodes utilisables est fournie par l'ECVAM sous forme de 2 fichiers consultables :

- DB-ALM (Data Base on Alternative Methods), qui donne des explications sur plus de 300 méthodes alternatives,

- TSAR (Tracking System for Alternative methods toward Regulatory acceptance), qui montre le statut des alternatives (en développement, validées ou acceptées réglementairement).

Cette liste est également présentée en annexe I et II du rapport européen ECVAM de 2017 (11).

Les méthodes alternatives sont très présentes dans le domaine du contrôle de qualité des produits biologiques ainsi que dans l'évaluation de la toxicité des produits, notamment sur la peau ou l'œil, la phototoxicité, la corrosion ou l'irritation. Les méthodes in vitro, et les cultures cellulaires en particulier, permettent de tester des produits chimiques à grande échelle.

Des méthodes alternatives sont également développées pour la recherche fondamentale comme dans la recherche sur les cancers (culture in vitro de nodules cancéreux humains), le diagnostic de maladie ou l'évolution d'une maladie, des mécanismes d'action (organoïdes ou organes sur puce qui reproduisent l'épithélium cutané ou les muqueuses respiratoires, l'épithélium alvéolaire ou branchial).

Les progrès de ces méthodes sont assez récents et résultent des avancées en biologie cellulaire et moléculaire, en bio-informatique et dans les techniques de modélisation (ex les *OMICS* : référence aux différentes technologies de caractérisation des molécules biologiques à grande échelle : génomique, transcryptomique, protéomique, métabolomique).

Ces méthodes regroupent :

- Les cultures de tissus, d'organes ou de cellules (humaines ou cellules souches),
- Les organoïdes (représentation en culture cellulaire d'un organe avec ses spécificités),
- Les organes sur puce,
- Les modélisations informatiques : moléculaires (omics), la bio-simulation (reproduction du système neuronal dans les études sur la maladie de Huntington), calculs par ordinateur des doses de médicament à délivrer à un patient, modélisation mathématique des connaissances scientifiques,
- Le bio printing (en combinant la biologie cellulaire et le génie physique, la conception et l'impression tridimensionnelle d'une gamme de modèles de tissus humains devient possible. Cette technologie propose des tissus à l'architecture adéquate et entièrement composés de cellules humaines. Des modèles de foie, d'os et de tissu cardiaque ont déjà été mis au point).

Toutefois, ces méthodes ne peuvent se substituer totalement à l'expérimentation animale : un organisme est un ensemble complexe faisant appel à une cascade de réactions pour son fonctionnement qui ne sont pas reproductibles (ex : mécanismes de rétro action, de régulation complexes). De plus le prélèvement de tissus ou organes en vue d'une culture in vitro peut nécessiter le sacrifice de l'animal donneur, le remplacement est alors une notion

toute relative. C'est pourquoi, les scientifiques préfèrent employer le terme de méthodes complémentaires.

L'intérêt des méthodes alternatives de nos jours est dans l'intégration des trois approches : in vivo, in vitro et in silico.

B-3-2 : <u>choix du modèle animal</u>

L'utilisation des modèles animaux fait partie des principaux outils à la disposition du biologiste pour interroger et comprendre le vivant. Elle seule permet d'étudier les réponses intégrées d'un organisme ainsi que les interactions entre cellules, tissus et organes qui le composent. Elle seule permet aussi, sans recourir à l'expérimentation sur l'homme, d'analyser les causes des maladies, d'envisager des traitements et d'en tester l'efficacité, l'innocuité ou les effets secondaires. *« Au fondement de toute expérimentation animale, il y a un organisme qui va servir de modèle à un autre, plus sensible, moins accessible ou plus difficilement manipulable »* (PIGENET Y., »peut-on se passer des modèles animaux », 2017) (12).

Le remplacement peut se faire par le choix d'une espèce animale, d'un type ou d'un stade évolutif moins sensible. *« Du point de vue scientifique, on choisit un modèle animal selon trois critères principaux : d'abord la similitude du modèle avec les caractéristiques du phénomène étudié chez l'espèce cible – souvent l'homme –, ensuite, en recherche biomédicale, le degré de similitude entre le mécanisme biologique de la maladie humaine étudiée et celui du modèle lui-même, enfin en recherche préclinique, la similitude des réponses à un traitement pharmacologique »* explique le généticien Yann Hérault (13) (citation tirée de l'article de Y. Pigenet).

L'expansion de la recherche biomédicale ces cinquante dernières années a conduit à une multiplication et une spécialisation des modèles animaux et, il existe maintenant des banques d'animaux modèles.

On sait désormais que nous partageons 60% de nos gènes avec la mouche drosophile et 90% avec la souris. Il existe plus de 2000 types de souris transgéniques (modifiées génétiquement pour surexprimer un gène) ou knock-out (modifiées génétiquement pour supprimer l'expression d'un gène). C'est grâce à ce type de souris que l'on peut étudier en partie le VIH chez la souris alors que, normalement, elle n'est pas affectée par ce virus (14).

Le remplacement pourra se faire aussi par l'utilisation d'organismes à des stades de développement où il n'y a ni douleur ni stress (œufs de poule à un stade précoce d'incubation ou des œufs de poisson), ou des microorganismes ou animaux « inférieurs » (vers nématode, mouche drosophile).

C'est grâce au modèle drosophile, moins sensible qu'un mammifère, que Jules Hoffman a dévoilé les mécanismes de l'immunité innée, lui valant alors le prix Nobel de physiologie en 2011.

a- la mouche drosophile comme modèle

La mouche drosophile, dont l'espèce la plus répandue est *Drosophile melanogaster* est utilisée en recherche scientifique depuis de nombreuses années. Le premier à l'utiliser fut Charles W. Woodworth au début du XXème siècle. Dès 1908, Thomas Hunt Morgan débute ses travaux sur les principes de la reproduction sexuée et des caractères phénotypiques liés au sexe en utilisant des drosophiles, ce qui lui valut un prix Nobel en 1933 (15).

La mouche drosophile est l'objet de multiples travaux, principalement en génétique et développement, répertoriés dans une base de données spécialement dédiée : flybase.bio.indiana.educ. L'intérêt de la mouche drosophile réside dans le fait qu'elle est facilement manipulable, qu'elle ne transmet pas de maladie à l'homme, qu'elle se reproduit vite et que son matériel génétique est simple mais qu'il contient quand même toute la complexité de celui d'un organisme supérieur.

La capacité de reproduction de la drosophile est telle (cycle biologique de 12 jours), qu'elle permet d'étudier un grand nombre de générations dans un délai relativement bref (25 générations en un an contre une génération tous les 25 ans chez l'homme).

Le caryotype de la drosophile se compose de quatre paires de chromosomes, son génome est de faible taille (170 mégabases contre vingt fois plus chez l'homme ou la souris) tout en ayant que deux fois moins de gènes (15000 contre 30000 chez l'homme). Cette caractéristique facilite son étude bien que sa complexité ne soit guère différente de celle des vertébrés. Les modifications génétiques, spontanées ou provoquées rendent possibles des études génétiques très précises et l'utilisation de la drosophile n'entraîne aucun enjeu éthique, d'un point de vue réglementaire.

b- le ver nématode comme modèle

Le ver *Caenorhabditis elegans (C. elegans)* est aussi très utilisé car c'est un organisme simple dont le nombre total de cellules est limité chez l'adulte, et son patrimoine génétique est identique à 60-70% à celui de l'homme. Ce ver est omniprésent dans le sol à une échelle microscopique. Transparent, il ne mesure qu'un millimètre de long.

Très utilisé depuis cinquante ans, il est à l'origine de trois prix Nobel dans les domaines de la médecine, de la physiologie et de la chimie.

Dans les années 1990, *C. elegans* est devenu le premier organisme vivant dont le profil génétique complet a été tracé, ouvrant la voie au séquençage du génome humain. Aujourd'hui encore, ce nématode est l'un des modèles expérimentaux les plus utilisés pour la recherche cellulaire et génétique dans les laboratoires du monde entier. Il est doté d'un système nerveux extrêmement rudimentaire. En effet *C. elegans* ne possède que 300 neurones dont on connaît exactement tout le réseau de connexions. De plus, son cycle de vie dure deux semaines, ce qui permet d'obtenir rapidement des réponses à des questions scientifiques. Ce ver invertébré, dépourvu de système nerveux central, peut grandement contribuer à réduire les expériences sur souris, rats et autres vertébrés, qui occasionnent des souffrances.

B-4 : RAFFINER

Le raffinement, troisième R de la règle de Russel et Burch, consiste à optimiser l'expérimentation dans le but de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subis par les animaux. Le but visé est d'améliorer les conditions de transport, d'élevage et d'hébergement, d'établir des points limites, de privilégier des procédures non invasives, de recourir à l'anesthésie/analgésie si le protocole est douloureux, et d'utiliser les procédures d'euthanasie appropriées.

Ce souci de raffinement doit être une préoccupation permanente tout au long de la vie des animaux et pendant les différentes étapes du protocole expérimental.

B-4-1 : Conditions de vie des animaux

Les conditions de vie des animaux de laboratoire sont strictement encadrées par la directive européenne de 2010. Seuls les établissements agréés et enregistrés par les autorités compétentes peuvent héberger ces animaux. Cet agrément n'est pas permanent, il est soumis à des contrôles réguliers. Ces établissements doivent disposer d'installations et d'équipements adaptés aux espèces qui y sont hébergées et qui permettent le bon déroulement des procédures, lorsqu'elles y sont réalisées. Les dimensions et normes des locaux d'hébergement sont détaillées espèce par espèce dans l'annexe IV de la directive du parlement européen et du conseil relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

On entend par locaux d'hébergement les pièces où les animaux sont logés normalement pour la reproduction, l'élevage ou la conduite d'une procédure. Ils doivent tenir compte des besoins des espèces hébergées en matière :

- d'espace : (au sol et en hauteur) : les animaux doivent pouvoir disposer de suffisamment d'espace pour se déplacer, avoir des interactions avec leurs congénères s'ils appartiennent à des espèces sociales, pour se dissimuler, dormir et manger en des points multiples (par exemple pour les hamsters, surélévation de la cage pour que les animaux puissent grimper),
- de richesse du milieu de vie : pour se rapprocher au plus près des conditions de vie naturelles, il est nécessaire de fournir aux animaux les moyens de s'exprimer. Par exemple de simples bouteilles en plastique vides permettront aux souris de créer des nids, des terriers ou des urinoirs (Boyd, 1988) (16), diversifier la distribution d'aliments pour les primates (jus de fruit congelés, dispositifs augmentant le temps consacré à la nourriture...),
- du comportement sociétal : les lapins, animaux sociaux dans la nature sont plus souvent en cages individuelles afin de limiter les blessures dues aux bagarres, pour empêcher l'ovulation et les pseudo-gestations dues aux interactions physiques chez les

adultes (17). Les souris subissent un stress minimal si elles sont hébergées à 4 plutôt qu'à 2 ou 8 (18).

Les locaux doivent assurer des conditions d'hygiène satisfaisantes (choix des matériaux, facilité de nettoyage, séparation des différentes zones de stockage des aliments, déchets ou consommables, aération à double flux sans récupération de la chaleur). Il existe quatre types d'animalerie, classées A1 à A3 et A1+ (pour les animaux dits « germ free »), les normes étant différentes pour chacune d'entre elles (cf. annexe IV).

La sécurité des animaux et du personnel doit y être assurée (conception des cages, vêtements de protection, zone de quarantaine pour les nouveaux arrivés). L'animalerie doit être séparée des laboratoires afin d'assurer aux animaux un certain calme (éviter les alarmes des appareils et les déplacements des personnels), être munie d'un système de ventilation, chauffage et éclairage adaptés aux espèces utilisées. L'accès se fera par un sas d'isolation et sera réservé aux seules personnes autorisées.

Toutes les informations relatives aux animaux (entrée, sortie, protocoles subis), seront notées dans un registre à conserver un minimum de 5 ans (arrêté du 19 avril 1988 annexe I art 26).

Le personnel en charge de l'animalerie doit veiller à sociabiliser les animaux, les habituer aux manipulations (training), en fonction de l'espèce concernée, de manière à rendre les manipulations moins anxiogènes, d'éviter le recours à l'anesthésie pour des actes non-invasifs et non douloureux. Par exemple, dans le cas du chien, animal le mieux domestiqué, une absence de sociabilisation du chiot va donner un animal difficile à manipuler et dont les variables physiologiques seront impactées par le stress et donc plus difficilement interprétables. De plus, ce comportement de panique va à l'encontre du bien-être animal et n'est acceptable pour personne. L'aptitude à s'adapter à une situation quand une personne intervient, ou quand le milieu change, constitue un critère fondamental de bien-être chez le chien (19). Cette sociabilisation sera également un atout dans le processus de réhabilitation de l'animal et doit être prévue dans les mises au point des protocoles.

B-4-2 : <u>gestion de la douleur et points limites</u>

Selon le Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA), la douleur se définit comme une expérience sensorielle déplaisante et elle est accompagnée de dommages réels ou potentiels.

Toute souffrance, détresse et inconfort réels ou potentiels doivent être minimisés ou soulagés, à l'aide de molécules, chimiques ou non, et grâce à la mise en place de points limites.

a- gestion de la douleur

L'administration d'analgésiques ne permet pas de faire disparaître la douleur mais permet de la réduire et de la rendre tolérable. Selon l'université de Laval au Canada : « une théorie jugée douloureuse si elle était pratiquée chez l'humain doit être considérée comme douloureuse pour l'animal, et s'il y a un doute quant à la présence de douleur suite à une procédure, ce doute doit pencher en faveur du bien-être animal. »(20).

Il est impératif, lors de l'élaboration d'un protocole d'expérimentation que le chercheur, en partenariat avec le vétérinaire prévoit la douleur que l'animal va endurer et planifie l'emploi d'analgésiques en adéquation avec la douleur qui sera infligée. Un plan d'urgence devra également être établi pour pallier aux « imprévus » (complications post-opératoires par exemple), et ce, sans interférer avec l'étude menée.

Le choix de l'analgésique doit se faire en fonction de :
- la cause et l'intensité de la douleur,
- la durée de l'analgésie requise,
- l'espèce animale, le mode d'administration et le volume à administrer,
- les effets secondaires possibles et leur influence sur les résultats de l'étude.

Il est parfois nécessaire d'avoir recours à une association de molécules afin d'obtenir l'effet désiré. Il conviendra alors de bien évaluer les effets cumulatifs ou les interactions médicamenteuses par rapport au bénéfice réel.

On dispose à l'heure actuelle d'un arsenal médicamenteux très large :

1. *Les anesthésiques locaux* : appliqués avant l'acte, ils bloquent le stimulus nerveux avant qu'il n'atteigne le système nerveux central. Ils ont peu d'effets au niveau systémique et n'entraînent pas de modification des paramètres physiologiques (donc pas d'influence sur les résultats de l'étude). Ils peuvent être appliqués directement au contact de la peau, en injection autour d'un nerf ou en épidural (ex : application de crème EMLA sur l'oreille des lapins avant une injection ou une prise de sang). Leur usage doit être modéré chez les animaux de petite taille car la dose toxique est rapidement atteinte.

2. *Les AINS :* ils sont employés en cas de douleur ou d'inflammation légère à modérée et pour leur action antipyrétique. Ils ont peu d'effets sur la douleur d'origine viscérale, et leur action est très variable suivant les espèces. S'ils ont peu de répercussions sur le système cardiorespiratoire, leurs effets secondaires sont non négligeables aussi bien au niveau rénal, digestif que sanguin (effet anti-agrégant plaquettaire). Leur usage doit être précautionneux en cas d'administration répétée dans le temps, d'administration conjointe avec d'autres AINS ou corticoïdes.

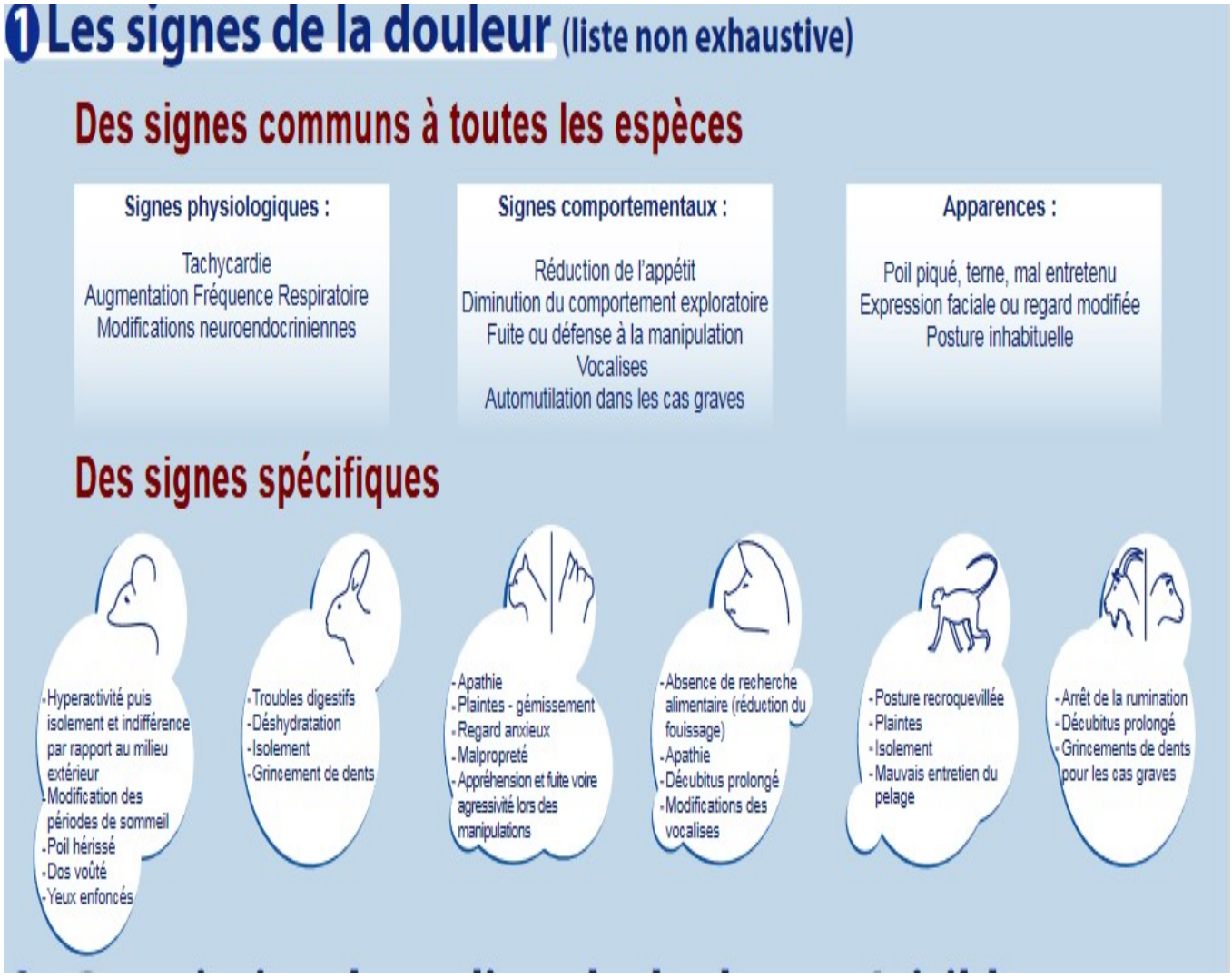
3. *Les morphiniques ou opioïdes :* on les utilise en cas de douleur modérée à intense. Ils agissent directement sur les récepteurs au niveau central. Leur action est variable suivant la molécule utilisée (lié aux récepteurs morphiniques activés : mu, kappa ou delta), l'espèce ou la dose administrée. Ils ont le plus souvent un effet sédatif et sont antagonisables. Leurs effets secondaires sont une activité dépressive

au niveau cardiaque et respiratoire, et une tendance à l'hypothermie. Leur usage est règlementé et doit être noté dans un registre (molécule utilisée, dose, motif). Les molécules disponibles sont la buprénorphine, la morphine, le fentanyl par exemple.

4. *Alpha-2-agonistes :* ces molécules (xylazine, médétomidine, romidine) ont une action analgésique efficace surtout sur la douleur viscérale mais elles sont le plus souvent utilisées pour leur action sédative, anxiolytique et myorelaxante. Il existe un antagoniste, l'atipamézole. Leurs effets secondaires sont importants : dépression cardiovasculaire, troubles du rythme et vomissements.

5. *Autres :* la kétamine a peu d'effet analgésique, elle agit sur une courte durée et doit être administrée en association avec une autre molécule pour obtenir l'effet escompté et avant l'apparition d'un stimulus nerveux (effet wind up). Son usage est également règlementé. Le tramadol et la gabapentine peuvent également être intéressants.

La figure ci-dessous nous récapitule le schéma décisionnel.



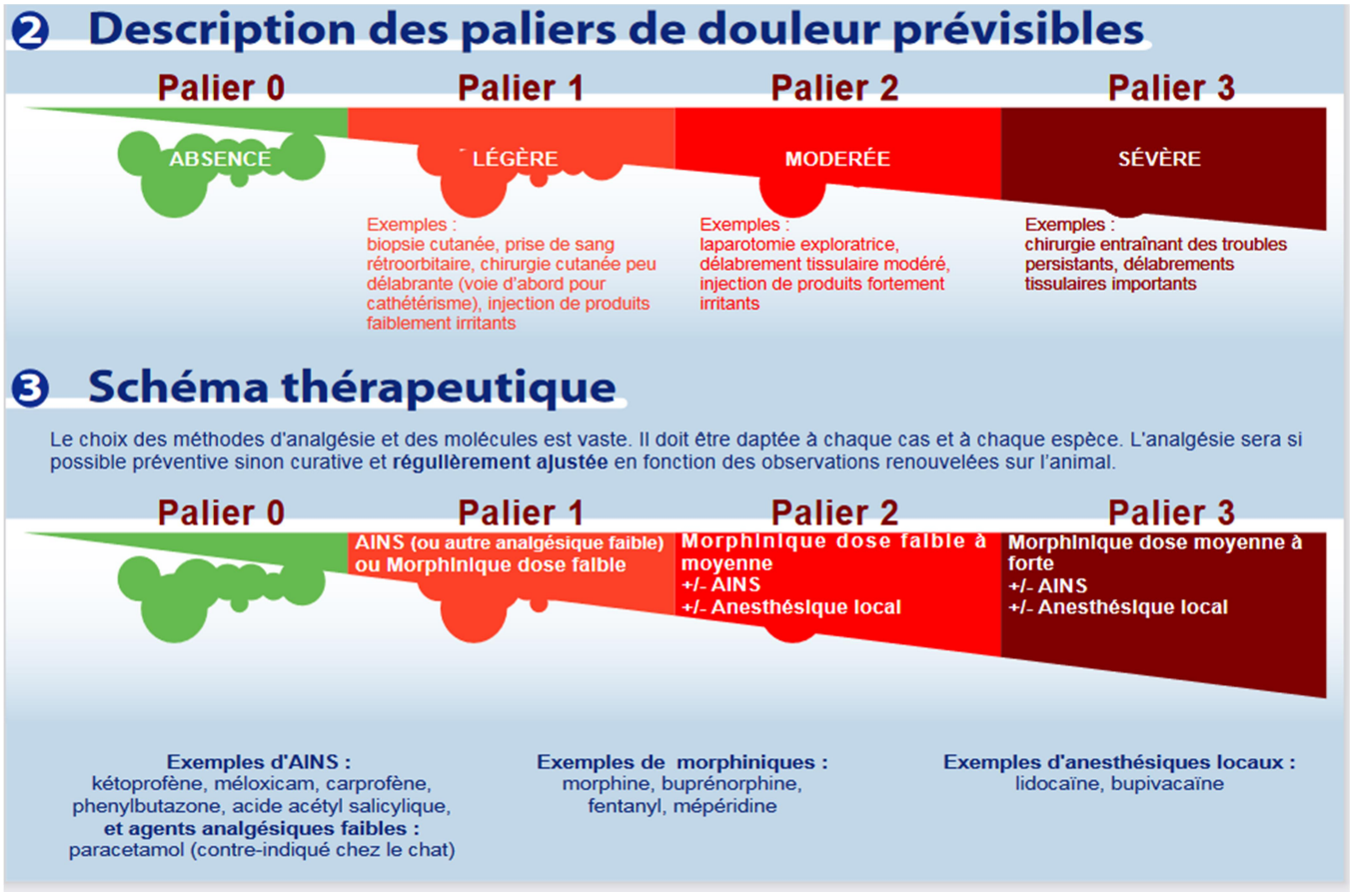


Fig.4 : choix de la molécule en fonction de la douleur (source : la douleur de l'animal au cours d'une expérimentation, biosit.univ-rennes1.fr)

b- le point limite

Le point limite, traduction du terme anglais « end point », est le moment à partir duquel la souffrance ou la détresse d'un animal de laboratoire doit être diminuée, minimisée ou arrêtée en prenant des mesures adéquates comme décider de mettre fin à la procédure qui le fait souffrir, d'euthanasier le sujet ou le lot de manière humanitaire ou de le traiter de manière à soulager sa souffrance ou sa détresse.

La détermination du point limite sert à éviter aux animaux des souffrances ou des angoisses inutiles. Il doit se situer avant l'apparition de signes cliniques irréversibles dommageables. La mort n'est en aucun cas un point limite acceptable.

Les autres termes utilisés sont : point d'arrêt anticipé, critère d'interruption, point limite éthique ou point d'arrêt précoce.

La mise en place du point limite relève de la directive 2010/63/UE, articles 13, 23 et 37.

La détermination de ce point se fait conjointement entre : le responsable du projet, le vétérinaire responsable de la structure et la SBEA. Le responsable du projet doit, dans sa

demande d'autorisation, clairement identifier ce point limite, le justifier, renseigner les modes d'observation des animaux (grille de score) (annexe V), la fréquence d'observation, le personnel habilité, et les mesures envisagées si ce point est atteint.

L'établissement du point limite se fera suite à des recherches de critères déjà établis dans la littérature spécialisée, à l'aide de résultats de recherches dans un domaine similaire ou de mise en place d'une étude pilote si aucun résultat n'est disponible (protocole appliqué sur un petit nombre d'animaux servant à déterminer la morbidité, la durée des effets d'une molécule).

L'avis du vétérinaire est primordial dans la mesure où il est un spécialiste de la physiologie animale et qu'il connaît les signes cliniques liés à l'évolution d'un processus pathologique.

L'observation est effectuée par les agents animaliers en charge des soins aux animaux et la décision revient au responsable scientifique.

Les grandes lignes d'une observation appropriée ont été établies par Morton et Griffith (21) et se fondent sur les 5 critères suivants :

1. variation du poids de l'animal (et variation de l'ingestion de nourriture et d'eau),
2. apparence physique externe,
3. signes cliniques mesurables (rythme cardiaque, respiratoire, température),
4. changement de comportement,
5. réponses comportementales aux stimuli extérieurs.

L'observation des animaux doit se faire régulièrement une à plusieurs fois par jour et plus en cas de doute. Une valeur objective est assignée à chaque critère (0=normal 3=changements importants par rapport au comportement normal).

La formation du personnel joue là un rôle prépondérant afin d'éliminer la variabilité liée à des observateurs différents. La connaissance du comportement normal de l'espèce étudiée permet de mieux détecter les comportements anormaux. Chaque critère préétabli est noté et la somme donne un critère cumulatif, et c'est ce critère qui compte pour le score de l'animal.

Le point limite est établi pour chaque animal mais aussi pour un lot d'animaux. En cas d'atteinte de ce point limite, une décision d'euthanasie peut être prise.

A ce stade, le rôle du vétérinaire est au premier plan. Il intervient en tant que professionnel de santé et du bien-être animal. Le diplôme de docteur vétérinaire auquel s'ajoute une formation spécifique (CEAV et DESV en Science et Médecine de l'Animal de Laboratoire) lui permet d'intervenir en qualité de formateur du personnel soignant et de conseiller en situation de crise.

La figure 5 ci-dessous résume le processus décisionnaire.

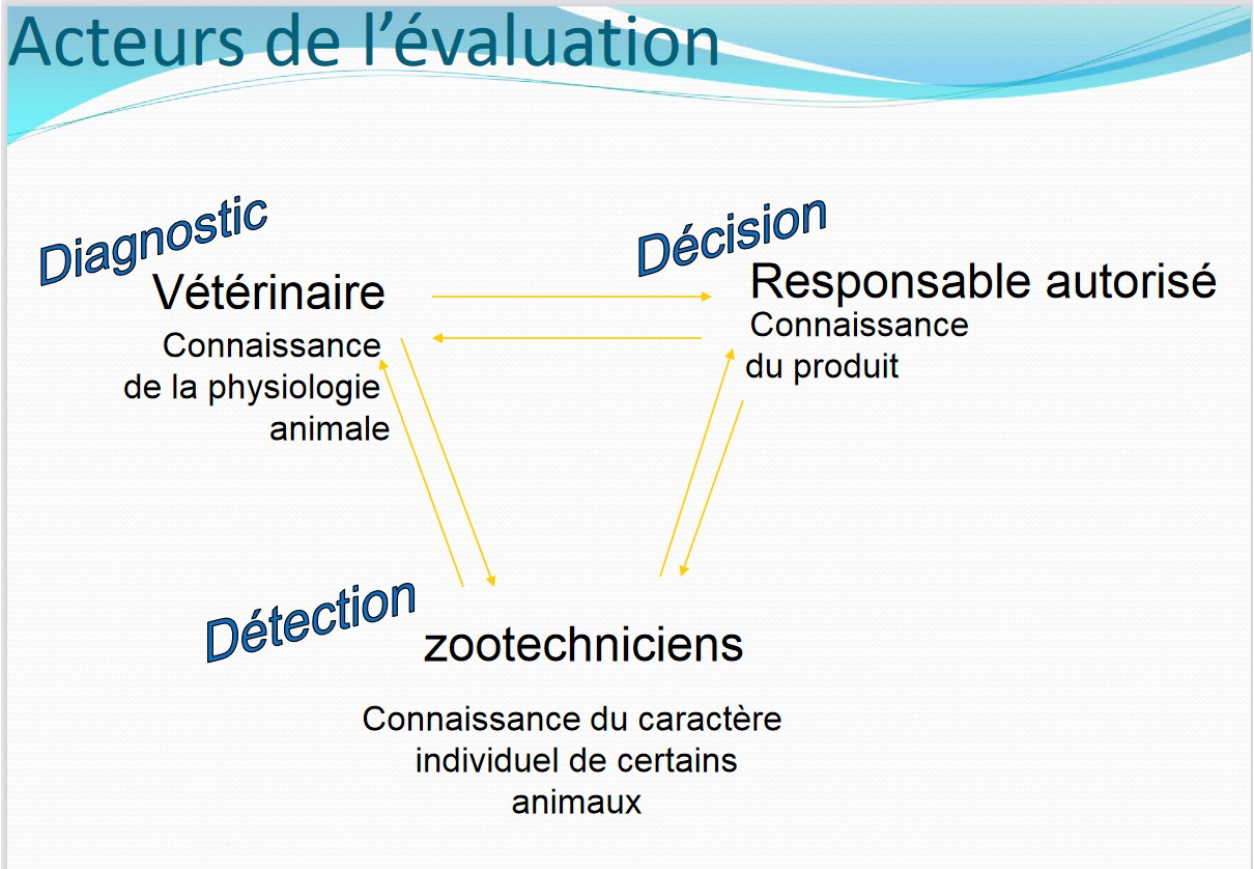


Fig. 5 : les acteurs de l'évaluation du bien-être animal (Observation et suivi des animaux de laboratoire : bonnes pratiques au quotidien AFSTAL juin 2011).

B-4-3 : L'euthanasie

L'euthanasie peut être décidée pour plusieurs raisons :
- le protocole expérimental l'exige (classe d'expérimentation sans réveil),
- l'animal en expérimentation éprouvera les effets de dommages irréversibles ou durables (décret n°87-848, art.4) ou il est probable qu'il subira une angoisse ou des douleurs permanentes (directive 86/609, art.9),
- en fin d'expérimentation pour tous les animaux transgéniques,
- si le point limite est atteint, même si l'expérimentation n'est pas terminée.

L'euthanasie doit se pratiquer selon des méthodes réglementaires (Art. R. 214-98, Annexe IV de l'arrêté du 1er février 2013), le plus tôt possible après la fin du protocole expérimental ou, lorsque la procédure est effectuée sous anesthésie générale ou analgésie, avant la fin de leurs effets. Le personnel autorisé à pratiquer l'euthanasie des animaux doit posséder les compétences adéquates : niveau de formation requis, connaître la façon la

plus adaptée et la plus éthique pour accomplir cette tâche, reconnaître les signes de douleur et de détresse et savoir identifier les signes de perte de connaissance et de mort selon les espèces.

Les critères d'une mise à mort éthique, selon le Dr Degryse du CNRS, sont au nombre de 10 :

1. la mort doit survenir sans signe de panique, douleur ou détresse,
2. la perte de connaissance doit se produire dans les plus brefs délais,
3. la méthode utilisée doit être sûre et reproductible,
4. la sécurité du personnel doit être assurée,
5. elle doit produire un minimum d'effets physiologiques et psychologiques sur l'animal,
6. elle doit être conforme aux exigences et aux buts de l'étude,
7. elle doit avoir un impact minimum sur le milieu ou sur l'écologie,
8. elle doit produire un minimum d'effets émotifs sur l'observateur et sur le personnel qui effectue l'euthanasie,
9. l''équipement doit être simple, peu coûteux et requérir relativement peu d'entretien,

le lieu où se pratique l'euthanasie doit être éloigné et séparé des locaux d'hébergement des animaux.

Les méthodes d'euthanasie dépendent de l'espèce concernée, du stade de développement, du nombre d'animaux à sacrifier et de l'expérimentation. Il y a des méthodes : - physiques (commotion, dislocation cervicale, décapitation, décérébration, abattage par percussion ou arme à feu, électrocution, irradiation par micro-onde, exsanguination et congélation),

-chimiques (agents gazeux anesthésiques comme le chloroforme, l'éther ou l'isoflurane ou non anesthésiques comme le monoxyde ou dioxyde de carbone, l'azote, les agents pharmacologiques injectables, embutramide-T61ND, hydrate de chloral, pentobarbital et autres barbituriques, KCL, benzocaïne...).

Les méthodes d'euthanasie se classent en :

-méthode acceptables,

-méthodes acceptables sur animal inconscient,

-méthodes inacceptables.

Certaines méthodes nécessitent une sédation préalable.

Le tableau ci-après nous indique les méthodes préconisées dans l'arrêté ministériel du 1er février 2013suivant les espèces :

Tableau 1 : tableau des techniques appropriées en fonction des espèces (https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFARTI000027038011).

REMARQUES concernant les animaux/méthodes cryptographiques	POISSONS	AMPHIBIENS	REPTILES	OISEAUX	RONGEURS	LAPINS	CHIENS, chats, furets et renards	GRANDS mammifères	PRIMATES
Surdose d'anesthésique	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
Tige perforante	X	X	(2)	X	X		X		X
Dioxyde de carbone	X	X	X		(3)	X	X	X	X
Dislocation cervicale	X	X	X	(4)	(5)	(6)	X	X	X
Commotion/ Percussion de la boîte crânienne				(7)	(8)	(9)	(10)	X	X
Décapitation	X	X	X	(11)	(12)	X	X	X	X
Etourdissement électrique	(13)	(13)	X	(13)	X	(13)	(13)	(13)	X
Gaz inertes (Ar, N2)	X	X	X			X	X	(14)	X
Abattage par balle	X	X	(15)	X	X	X	(16)	(15)	X

Exemples de recommandation par espèce :

- Poissons : dislocation cervicale, anesthésique en balnéation, barbituriques IP.
- Amphibiens : anesthésique en balnéation, T61 en IV, pentobarbital IV ou IP.
- Oiseaux : CO2 (sauf oiseaux plongeurs), anesthésiques volatiles, barbituriques, T61, dislocation cervicale, commotion, électrocution.
- Rongeurs : dislocation cervicale (si poids inférieur à 150g), avec sédation (si poids supérieur à 150g), décapitation (si aucune autre méthode possible), pentobarbital IV ou IP, gaz anesthésiants inhalés ou CO2.Pour les fœtus dans le dernier tiers de la gestation, décapitation ou exsanguination et pour les nouveau-nés, décapitation.
- Lapins : dislocation cervicale (avec sédation si poids supérieur à 150 g) et décapitation pour les animaux de moins de 1kg, pentobarbital (IV ou IP dilué).
- Carnivores : pentobarbital, T61 IV après sédation, isoflurane.
- Primates non humains : sédation profonde puis pentobarbital en IV.

L’article R214-112 du code rural et de la pêche maritime, modifié par décret 2017-1246 du 7 aout 2017, article 12 prévoit toutefois des dérogations possibles :« le placement ou la mise en liberté d'animaux utilisés ou destinés à être utilisés dans des procédures expérimentales, dans un habitat approprié adapté à l'espèce, peuvent être autorisés par le préfet du département du lieu de ce placement ou de cette mise en liberté, sous réserve que l'état de santé de l'animal, certifié par un vétérinaire, le permette, qu’il n'existe aucun danger pour la santé publique, la santé animale et l'environnement et que des mesures appropriées aient été prises pour préserver son bien-être. »

Après avoir vu la règle des 3R dans son ensemble, nous allons à présent passer en revue les alternatives possibles à l’expérimentation animale, et considérer l’évolution de cette règle des 3R en règle des 4 voire 5R comme le préconisent maintenant nombre d’intervenants.

PARTIE II : ALTERNATIVES A L'EXPERIMENTATION ANIMALE

A : Généralités

A-1 : Définition

La terminologie « méthodes alternatives » a été introduite en 1978 par le physiologiste anglais David Smyth dans son ouvrage « Alternative to Animal experiments[i] ». (22)

Les méthodes dites alternatives sont l'ensemble des technologies ayant pour but de remplacer dans la recherche biomédicale celles fondées sur l'expérimentation animale. Elles peuvent également être appelées méthodes substitutives ou méthodes complémentaires et doivent pouvoir satisfaire un ou plusieurs R de la règle des 3 R.

A-2 : Les raisons et enjeux

Les exigences sociétales actuelles et l'évolution des textes réglementaires ont été promotrices du développement de nouvelles approches en matière d'expérimentation animale, ceci afin de réduire les essais sur les animaux.

En effet la pression du public et l'essor des groupes de défense animale ont obligé la communauté scientifique à repenser les approches traditionnelles, de même que les avancées intervenues dans le domaine des sciences du vivant ou les progrès en matière d'informatique ont permis des progrès remarquables ces dernières années.

L'évolution des méthodes substitutives doit beaucoup aux domaines du contrôle de la qualité des produits biologiques, de la toxicité des agents chimiques (notamment sur la peau et l'œil), domaines qui consommaient un grand nombre d'animaux puisque les législations européennes imposent des tests sur l'innocuité des produits chimiques.

Dans le domaine de la recherche fondamentale, ces méthodes ont été développées surtout en tant qu'outils d'étude des mécanismes biologiques avant d'y voir une application pratique ou une possibilité de réduire ou remplacer l'expérimentation animale.

Règlementation en vigueur

En 2009, l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques (OPECST) rend un rapport sur « les principes applicables à l'expérimentation animale et les méthodes alternatives à celles-ci ». Cette étude commandée par le bureau de l'Assemblée nationale est concomitante à la révision de la directive européenne de 1986, première directive en la matière. En 1993, apparaît la réglementation sur l'utilisation des animaux pour tester les produits cosmétiques et depuis le 11 mars 2009, il est interdit d'utiliser des animaux pour les tests de toxicité des cosmétiques. La nouvelle directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil, applicable depuis le 1er janvier 2013, demande que « pour une procédure donnée, quel que soit le domaine, soient choisies en priorité les méthodes alternatives reconnues par l'Union européenne, si elles existent ».

De plus, le règlement REACH (9) auquel doivent se soumettre les industriels, promeut des méthodes alternatives. Ce programme est un règlement européen (n°1907/2006) adopté le 18 décembre 2006 et entré en vigueur en 2007 mis en place pour sécuriser la fabrication et l'utilisation des substances chimiques dans l'industrie européenne. Il met en place un système intégré unique d'enregistrement, d'évaluation et d'autorisation des substances chimiques dans l'Union européenne.

Les organismes concernés :

Au niveau européen, l'ECVAM (centre européen pour la validation des méthodes alternatives) coordonne le développement et la validation des méthodes alternatives. Il met à disposition 2 types de fichiers :

- le DBALM (data base on alternative methods) qui fournit des explications sur plus de 3000 méthodes,

- le TSAR (tracking system for alternative methods towards regulatory acceptance) qui permet de visualiser le statut des méthodes : en développement, validées ou acceptées réglementairement.

Au niveau national, FRANCOPA est la plateforme dédiée au développement, à la validation et à la diffusion des méthodes alternatives. Créée le 6 Juillet 2007 sous la forme d'un GIS (groupement d'intérêt scientifique), elle compte à ce jour 15 partenaires contre 12 à sa création. Elle permet le partage et l'échange de données via son centre d'information.

Tous les pays européens disposant d'une plateforme nationale sont réunis au sein d'une plateforme européenne : ECOPA (European COnsensus Plateform on Alternatives).

A-3 : Validation d'une méthode alternative

Faire valider de manière officielle et légale une méthode dite alternative est un processus long (plus de 10 ans en général) et très coûteux. Cela passe par différentes étapes :

- le développement de la méthode,

- la pré validation,

- la validation,

- l'examen par les pairs (comité scientifique),

- l'adoption réglementaire à l'ECVAM, L'EDQM (direction européenne du médicament et soins de santé), et au REACH.

Au niveau international, c'est l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique) qui fixe principalement les lignes directrices concernant les protocoles expérimentaux et les méthodes alternatives utilisables, pour tester de manière réglementaire la sécurité des produits chimiques.

Les pays membres de l'OCDE ont la possibilité d'utiliser les méthodes alternatives autorisées par l'ECVAM mais n'y sont pas contraints. Il faudrait pour ça que l'Union européenne valide ces méthodes pour que leur utilisation devienne obligatoire (rapport 2017 : status report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods and approach,EURL).

La figure ci-après nous schématise le processus dit de validation :

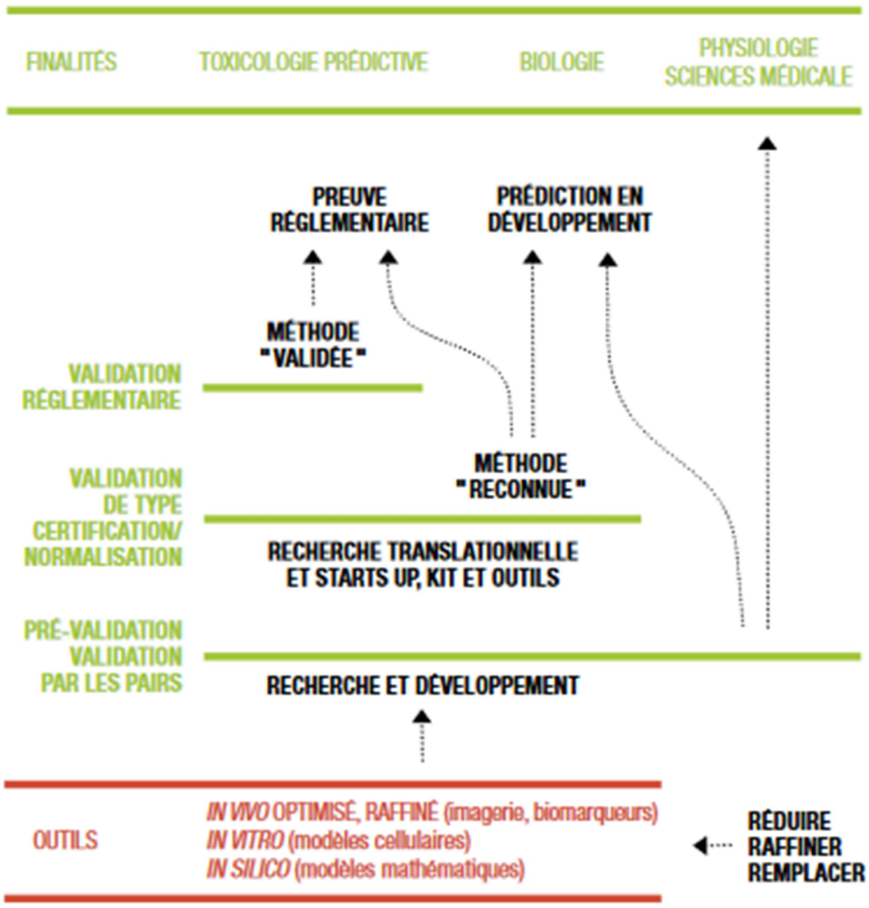


Fig. 6. **Le processus de validation** (les méthodes alternatives en expérimentation animale, INERIS références, décembre 2013)

En recherche fondamentale et appliquée, les méthodes alternatives sont utilisées librement sans contrainte de standardisation. Ces méthodes sont scientifiquement reconnues par le processus classique de la validation par les pairs, par la publication dans des revues scientifiques. On parle alors de méthode « reconnue », méthode qui peut être utilisée en amont d'un processus de validation par les industries.

La validation réglementaire est donc plus longue et contraignante que la validation scientifique car une méthode recevable doit apporter outre sa validation scientifique, les preuves qu'elle est applicable de façon :

- fiable,

- standardisable,

- reproductible,

- automatisable (intéressant dans les tests de toxicologie).

L'utilisation de ces méthodes validées permet alors une diminution significative du nombre d'animaux utilisés, une réduction des coûts liés à une expérience (une animalerie en comptant l'achat des animaux, leur entretien et les dépenses liés aux expérimentations font monter le budget de manière conséquente), une praticité d'utilisation et une augmentation de la fiabilité des essais.

A-4 : les différentes méthodes alternatives

Les méthodes alternatives ou substitutives se classent en 4 catégories principales que nous allons lister dans un premier temps avant de les étudier plus précisément par la suite.

Il y a donc les méthodes :

- *ex vivo*,
- *in vitro,*
- *in vivo*
- et *in silico.*

A-4-1 : Méthodes ex vivo

Le terme ex vivo, selon sa racine latine, signifie hors du vivant. Il s'agit de procédures exécutées hors de l'organisme par prélèvement de tissu ou cellules sur des animaux vivants et cultivés hors de l'organisme dont ils proviennent.

La méthode ex vivo est proche de la méthode in vivo par la provenance des échantillons mais se rapproche par la suite de la méthode in vitro. Elle permet d'effectuer des tests qui ne seraient pas éthiquement possibles sur des êtres vivants (exemple : Odette Prat, étude de la toxicité de 2 fongicides sur les testicules de rat, utilisation du modèle Bio-AlterND rapport Francopa 2018, expliqué ci-dessous) (23).

Fongicides et toxicité testiculaire :

Odette PRAT présente une étude dans laquelle un modèle ex vivo innovant a été développé afin de tester une toxicité envers les testicules de rat. L'étude présentée concerne la toxicité testiculaire de deux fongicides, le carbadenzim et l'iprodione en utilisant un modèle Ex vivo, afin d'évaluer leur mécanisme de toxicité sur la spermatogénèse, d'identifier des biomarqueurs potentiels de toxicité testiculaire. Le modèle utilisé (Bio-Alter®) est constitué d'un compartiment apical comportant les cellules germinales, de Sertoli et une membrane reposant sur le compartiment basal. Ce modèle mime la puberté du rat, période critique du cycle de vie en termes de perturbations endocrines. Les résultats démontrent que la méiose est clairement perturbée par ces deux fongicides. Grâce à cette méthode les effets cellulaires de deux fongicides et de leur mélange peuvent être quantifiés et comparés. Cette méthode peut donc être utilisée en tant qu'outil de screening dans le cadre de priorisation de perturbateurs endocriniens

L'avantage des méthodes ex vivo est que l'on dispose de modèles proches des conditions réelles. Par exemple pour la peau, on a :

- la même morphologie et structure,

- le même métabolisme,

- plusieurs voies d'application possibles (voie topique, solution dans le milieu de survie, application unique ou chronique, injection...),

- la possibilité de reproduire des interactions avec l'extérieur (UV, agressions chimiques ou physiques...).

Les limites de ces méthodes ex vivo sont celles des cultures cellulaires (durée de vie des cultures, dédifférenciation des cellules...) et l'origine des tissus ou cellules prélevés. En effet tous les tissus ne peuvent pas être prélevés sans dommage irréversible à l'organisme.

A-4-2 : <u>méthodes in vitro</u>

Le terme in vitro provient du latin qui signifie « sous verre ». L'appellation in vitro s'applique à toute activité expérimentale réalisée sur micro-organismes, organes ou cellules en dehors de leur contexte naturel (en dehors de l'organisme vivant) et dans des conditions définies et contrôlées (ECHA).

Il s'agit de modèles d'étude à l'échelle soit cellulaire grâce aux cultures de cellules, soit tissulaire avec la mise au point des organoïdes soit de systèmes plus complexes (notamment grâce à la microfluidique qui a permis l'émergence des organes sur puce).

Les lignées cellulaires proviennent d'animaux dont les cellules ont été prélevées dans le passé et aucun animal supplémentaire n'est alors requis. Quant à l'utilisation de tissu humain, des banques sont en développement mais de nombreux obstacles légaux et éthiques freinent leur mise en œuvre (utilisation de cellules souche embryonnaires par exemple).

Le terme in vitro couvre également d'autres techniques telles :

- les méthodes physico-chimiques par exemple : le « direct peptide reactivity assay » (DPRA) pour prédire un potentiel sensibilisant (il s'agit d'une méthode chimique visant à mimer une étape clé du mécanisme immunitaire menant à l'allergie de contact : la formation d'un complexe antigénique par réaction entre l'allergène et une protéine cutanée).Un autre exemple est la chromatographie liquide à Haute Performance (CLHP) pour remplacer les bio essais pour le contrôle de la qualité des protéines recombinantes.

- les systèmes reconstitués utilisant des récepteurs ou enzymes purifiés comme par exemple les systèmes cytochromes P450 reconstitués. Les cytochromes P450 (CYP) sont des hémoprotéines qui participent au métabolisme oxydatif de nombreux médicaments. Ils ont pour fonction l'oxydation des molécules au moyen de réactions chimiques très diverses. Ces

réactions donnent naissance à des métabolites inactifs, actifs ou toxiques. Il existe à l'heure actuelle des techniques in vitro bien validées, qui permettent d'identifier le(s) CYP impliqué(s) dans le métabolisme des nouvelles molécules, et de mettre en évidence les inhibiteurs de ces CYP. Ces techniques font appel à des microsomes hépatiques humains ou des cellules transfectées.

- les méthodes utilisant des bactéries (par exemple le test d'Ames aussi appelé le test de ***salmonelle***, test réglementaire qui permet d'évaluer le potentiel mutagène d'une substance ou d'un mélange en utilisant la bactérie Salmonella Typhimurium) ou des levures (test YES – YAS avec l'utilisation de la levure de boulanger (Saccharomyces cerevisiae) génétiquement modifiée, qui possède un gène exprimant le récepteur humain aux œstrogènes hERα, dit test YES (Yeast Estrogen Screen) ou le récepteur aux androgènes hAR, dit test YAS (Yeast Androgen Screen) couplé à un gène rapporteur). Les levures ont la capacité, par une suite de réactions enzymatiques, de produire la β-galactosidase dont la réaction enzymatique permet de mesurer les effets par une lecture en spectrométrie.

- les méthodes basées sur la réponse immune des systèmes cellulaires ou sur les propriétés antigéniques d'un médicament. Les méthodes in vitro en immunotoxicologie permettent d'étudier les effets immunosuppresseurs ou les effets immunoactivateurs. On a par exemple la mesure de l'activité proliférative des lymphocytes T ou des lymphocytes B (via l'usage d'activateurs poly-clonaux tels que la concavaline A ou la phytohémagglutinine ou bien via l'usage d'anticorps spécifiques anti-CD3 et anti-CD28) ou encore la mesure de la fonction Natural Killer (NK) ou de la phagocytose par les macrophages (rapport Francopa, 2010) (24).

L'inconvénient majeur des études in vitro réside dans le fait que les interactions entre le sujet d'étude et son environnement ne sont pas prises en compte, et que cela peut donner des résultats partiels voir erronés avec une transposition à un organisme entier difficile voire impossible. Il en est de même au sein d'un organisme, les méthodes in vitro ne tiennent pas compte des systèmes complexes de régulations hormonaux et nerveux.

A-4-3 : <u>méthodes in vivo</u>

L'allocution in vivo signifie en latin « au sein du vivant ». Ce terme qualifie les recherches ou examens menés sur un organisme vivant en respectant son intégrité.

Les méthodes in vivo sont principalement les méthodes d'imagerie médicale : IRM, scanner, TEP ou pet scan, rayons X, échographie.

A-4-4 : méthodes in silico

Cette expression est un néologisme d'inspiration latine sur le modèle in vivo ou in vitro, désignant une recherche ou un essai effectué au moyen de calculs complexes informatisés ou de modèles informatiques (l'internaute).

In silico fait référence au silicium, composant essentiel des transistors utilisés dans les ordinateurs.

Elle aurait été utilisée pour la première fois en littérature scientifique en 1991 par des microbiologistes danois dans une revue de l'institut Pasteur (25), puis son usage s'est généralisé à partir de 1996.

L'évolution de ces méthodes est directement liée aux progrès en matière de technologie de l'information et de la communication (TIC).

Leur usage doit beaucoup aux règles édictées par la FDA en matière de contrôle des médicaments. (ex: mise sur le marché du Botox aux USA. L'industrie pharmaceutique a réussi depuis 2011 à remplacer les tests sur des souris par une méthode utilisant des cellules humaines en culture). En effet cette instance a constaté que sur 10 molécules ou médicaments qui ont réussi à passer avec succès les tests sur animaux, 9 vont échouer au cours des essais cliniques chez les humains pour des raisons de toxicité ou par manque d'efficacité.

B- Les méthodes in vitro

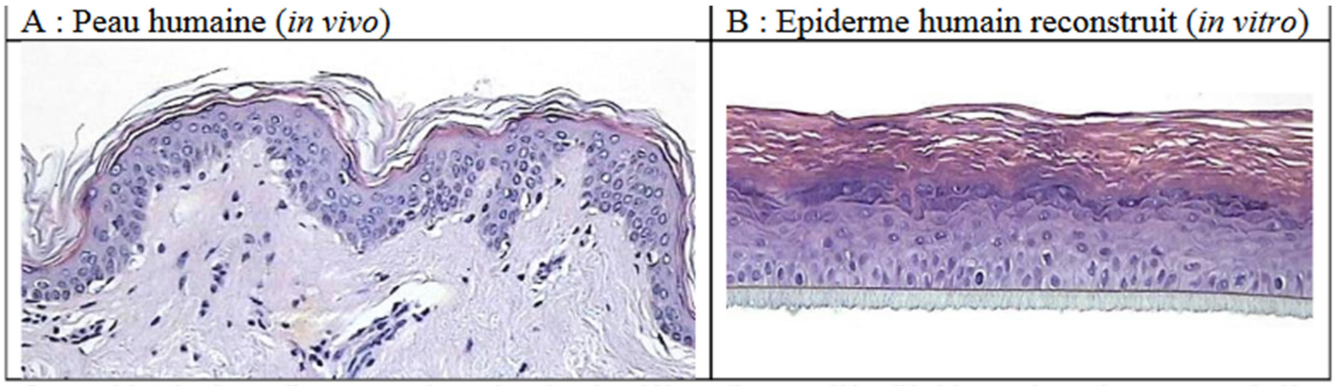
B-1 : Avantages et inconvénients :

Les cultures cellulaires permettent de simplifier les phénomènes biologiques puisque ne concernant qu'un type de cellules, on s'affranchit alors des interactions existant au sein d'un même organisme. On pourra identifier plus facilement les cibles cellulaires et tester dans plusieurs conditions expérimentales données, voire même plusieurs molécules.

L'utilisation de méthodes validées permet également des résultats plus rapides et fiables puisque ces méthodes ont été approuvées pour leur reproductibilité.

Si ces méthodes sont particulièrement intéressantes en toxicologie (tests de toxicité des substances chimiques, détermination des doses toxiques...) et en cosmétologie (grâce au progrès quant à l'élaboration de tissu épidermique, comme le montre la figure 7, ou oculaire), elles montrent leurs limites dans les autres domaines de recherche. En effet elles ne

permettent pas d'étudier les phénomènes complexes qui ont lieu dans un organisme entier tels les contrôles hormonaux avec rétrocontrôle, les phénomènes nerveux ou immunologiques.



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

Fig.7 : épiderme humain in vivo/in vitro (Etat des lieux des méthodes alternatives dans le domaine de l'expérimentation animale, Francopa 2012)

De même qu'une même molécule chimique peut avoir des effets bénéfiques in vitro, elle peut se révéler nocive voire toxique sur le reste de l'organisme. En effet tester une substance chimique sur un type cellulaire ou tissulaire ne révèle pas sa toxicité éventuelle, ni celle de ses métabolites au niveau hépatique par exemple. Si les différences de réponse interespèces sont limitées pour une cardiotoxicité ou une hématotoxicité, elles sont fréquentes pour une hépatotoxicité. Près du tiers des molécules qui se révèlent hépatotoxiques dans les essais cliniques ne provoque aucune lésion hépatique chez l'animal. Jean Louis Touraine affirme d'ailleurs dans un débat sur les méthodes alternatives que : *« avec une culture de cellules, le risque est plus grand du fait de l'absence de production de la totalité des métabolites, vous aurez votre molécule mais pas tous les produits de cette molécule, et vous n'aurez pas accès aux effets de concentration locaux qui peuvent apparaître après plusieurs jours de traitements ».*

De plus la tendance à la dédifférenciation cellulaire au fil des divisions, fait que la cellule initiale n'est plus représentative du type cellulaire choisi in vivo. Ce problème se résoudra avec l'utilisation d'organoïdes notamment (OPECST) ou de co-cultures.

Certaines maladies sont beaucoup trop complexes et font appel à beaucoup trop de processus biologiques pour pouvoir n'être étudiées que sur un type cellulaire (exemple de la maladie d'Alzheimer). De même il est impossible de reproduire fidèlement et intégralement dans des boîtes de Petri ou dans des éprouvettes des processus cognitifs ou mnésiques, le fonctionnement du système nerveux ou immunitaire, les mécanismes de la cancérogenèse ou la régulation de l'expression des gènes.

B-2 : cultures cellulaires

Les cultures cellulaires peuvent se faire à partir de plusieurs origines. Elles peuvent provenir de prélèvements directement sur l'organisme vivant, de lignées cellulaires particulières ou de cellules souches.

B-2-1 : Les cultures primaires

On parle de culture primaire quand les cellules proviennent d'un prélèvement sur un organisme (ex : biopsie).

Il existe deux types de cellules :

- les cellules libres et circulantes comme les cellules sanguines,

- les cellules en cohésion les unes avec les autres, constituant un tissu.

Les premières ne nécessiteront qu'un simple prélèvement suivi d'une centrifugation pour être mises en culture.

Pour que les cellules en cohésion puissent être cultivées, il faut rompre les liaisons intercellulaires avec la membrane basale ou avec la matrice cellulaire, soit par des méthodes enzymatiques (enzymes protéolytiques type trypsine ou collagénase), soit par des méthodes chimiques ou mécaniques. Les suspensions cellulaires ainsi obtenues sont alors purifiées par une succession de dilutions et de centrifugations à l'issue desquelles on pourra transférer ces cellules sur le milieu de culture choisi.

Ces cellules ne pourront être conservées qu'un temps donné car elles possèdent un potentiel mitotique limité, c'est ce qu'on appelle la limite de Hayflick (26). Ce biologiste a montré dans les années 1960 qu'une cellule humaine ne pouvait se diviser qu'une cinquantaine de fois. Aux alentours de cette limite, la cellule commence à montrer des signes de sénescence cellulaire ou sénescence réplicative, puis de mort cellulaire.

B-2-2 : Les lignées cellulaires

Une lignée cellulaire est une population homogène de cellules stables après des mitoses successives, et ayant, en théorie, une capacité illimitée de divisions in vitro. On parle aussi de cellules immortelles ou de d'immortalisation cellulaire. Trois types de cellules répondent à ces critères :

- les cellules post-crise : ce sont des cellules qui se sont immortalisées spontanément in vitro,

- certaines cellules tumorales (ex : cellules Hela, fig.8),

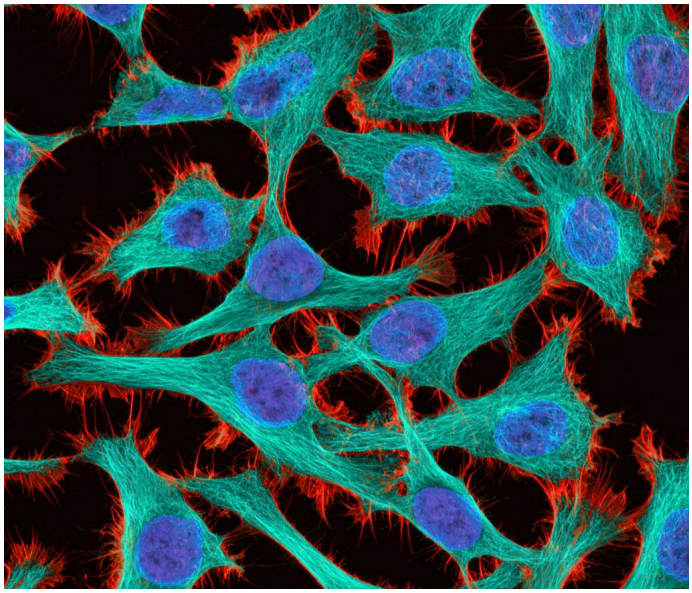


Fig.8 : cellules de la lignée d'une des plus anciennes cultures de cellules humaines, provenant de Henrietta Lacks, morte du cancer, et dont une lignée de cellule continue à être cultivée. (cdn. futura-sciences.com).

- des cellules immortalisées in vitro par un agent oncogène viral ou cellulaire (ex : virus SV 40 chez les rongeurs) (27) ou des cellules mutées pour des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (par exemple, la protéine p53, facteur de transcription qui joue un rôle de régulation dans les mécanismes cellulaires ; dans plus de 50% des cancers, on retrouve une mutation d'au moins un allèle du gène p53).

On utilise ces lignées cellulaires de manière courante dans les laboratoires car leur usage est plus aisé que les cellules en culture primaire. Néanmoins leurs caractéristiques cancéreuses peuvent être un frein à l'interprétation des résultats obtenus.

On retrouve la liste de différentes lignées cellulaires utilisées en Annexe I.

B-2-3 : Les cellules souches

Une cellule souche est une cellule indifférenciée, capable de s'autorenouveler, de se différencier en d'autres types cellulaires et de proliférer en culture. Les cellules souches sont les « cellules mères » à partir desquelles toutes les autres cellules vont pouvoir se développer (rôle de progéniteur).

Leur propriété d'immortalité serait due à une activité télomérase élevée, empêchant ainsi la dégénérescence chromosomique.

Elles peuvent être classées soit suivant leur origine soit selon leur potentiel.

a : <u>classement selon leur origine</u>

Leur origine peut être embryonnaire, fœtale ou adulte.

Les cellules souches embryonnaires sont divisées en 2 types :

- les cellules ES (embryonic stem) qui proviennent du blastocyste,

- les cellules EC (embryonal carcinoma) qui sont issues d'une tumeur appelée teratocarcinome.

Les cellules embryonnaires sont à l'origine de tous les tissus de l'organisme. Leur prélèvement à un stade précoce du développement (embryon de moins de 150 cellules, 5 à 7 jours après la fécondation, comme représenté dans la figure 9) entraîne la mort de celui-ci, ce qui donne lieu à de nombreux problèmes éthiques. On utilise des embryons surnuméraires congelés issus de fécondation in vitro ou obtenu par clonage (transfert du noyau prélevé dans un ovule à qui on a retiré son propre noyau). Suivant les conditions de culture (mise en suspension, apport de facteurs de croissance particuliers, matrice appropriée...), on peut induire et orienter leur différenciation vers le type cellulaire désiré : cellules hématopoïétiques, cellules nerveuses, cellules musculaires, kératinocytes.

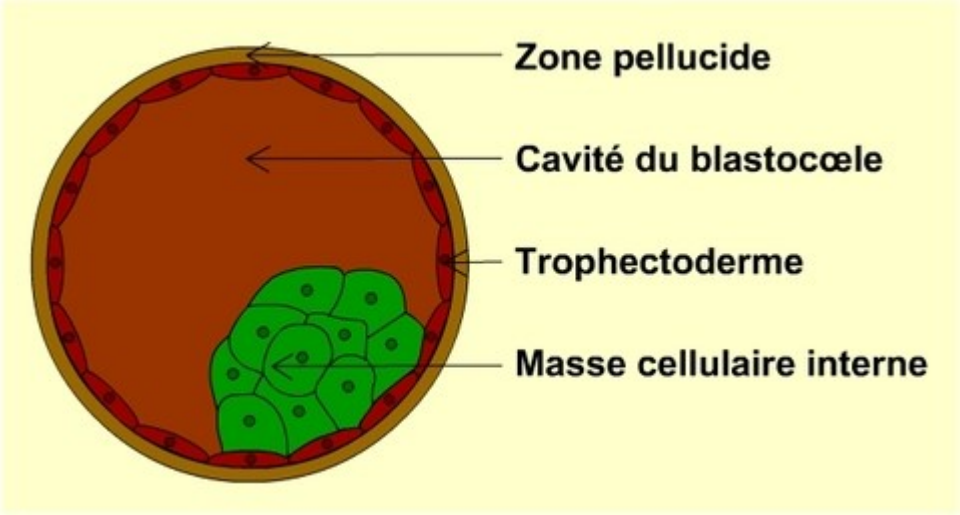


Fig.9 : **Schéma d'un blastocyste de 5 jours (0,14 mm) (les cellules souches, Planet-Vie)**

La plupart du temps les scientifiques travaillent à partir de lignées détenues et commercialisées par des laboratoires ce qui évite un sacrifice inutile d'embryon. Mais parfois

il est nécessaire de créer une nouvelle lignée et cela se fera sous l'égide du comité consultatif national d'éthique.

Les cellules souches d'origine fœtale (cellules EG : embryonic germ cells) ont la particularité d'être déjà orientées vers un type cellulaire. Elles proviennent en général d'embryons issus d'une IVG.

Les cellules souches adultes sont des cellules indifférenciées que l'on trouve au sein de tissus composés en majorité de cellules différenciées. Elles sont capables de donner naissance à différentes lignées d'un tissu donné, mais le type cellulaire reste lié au tissu d'origine. Elles sont présentes en petite quantité et sont moins faciles à cultiver que des cellules souches embryonnaires. On les trouve notamment dans la moelle osseuse (souches hématopoïétiques à l'origine des cellules sanguines), dans l'épiderme (cellules souches kératinocytaires) ou dans le tissu adipeux (cellules souches mésenchymateuses). Les cellules souches issues du sang du cordon ombilical sont également une bonne source de cellules hématopoïétiques offrant un potentiel thérapeutique d'avenir dans le traitement de maladies sanguines graves.

L'avenir des cellules souches est peut-être dans le développement des cellules iPS (« induced pluripotent stem cells »: cellules souches pluripotentes induites). Cette découverte du japonais Yamanaka a été récompensée par le prix Nobel de médecine en 2012 (28). Cela consiste à prélever pratiquement n'importe quelle cellule chez un adulte et à la reprogrammer génétiquement pour la rendre capable de se multiplier à l'infini et de se différencier dans tous types de cellules qui composent un organisme adulte. Ceci est la caractéristique d'une cellule pluripotente. La reprogrammation génétique consiste à réactiver des gènes et des signaux embryonnaires de dédifférenciation et de prolifération illimitée : réactiver la pluripotence éteint les gènes de différenciation exprimés par la cellule au stade adulte.

Les cellules ainsi obtenues peuvent être produites en quantité illimitée, à très grande échelle, sans destruction d'embryon, à partir de donneurs sains ou de personnes souffrant d'une maladie particulière. Dans ce cas, on peut reproduire fidèlement la maladie du donneur, comprendre ses mécanismes d'action et tester des molécules thérapeutiques. Toutefois, il convient de veiller à ce que les cellules obtenues à partir de cellules iPS ne soient pas modifiées sur le plan fonctionnel, immunologique ou tumoral, la reprogrammation risquant d'induire des mutations ou des modifications génétiques pouvant altérer leur fonctionnement (29).

b- <u>classement selon leur potentiel de différenciation</u>

Les cellules souches peuvent être unipotentes, multipotentes, multipotentes induites, pluripotentes ou totipotentes.

Les cellules souches unipotentes sont des cellules qui ne peuvent donner qu'un seul type cellulaire (foie, peau, cerveau...) mais qui sont aussi capables d'auto-régénération.

Les cellules souches multipotentes sont des cellules fœtales et adultes. Elles peuvent donner naissance à plusieurs lignées cellulaires d'un même tissu (ex : les cellules souches myéloïdes

de la moelle osseuse qui donnent les différentes cellules sanguines : érythrocytes, monocytes, granulocytes...)

Les cellules souches pluripotentes sont des cellules embryonnaires et des cellules iPS. Elles sont issues d'un embryon de 5 à 7 jours ou après reprogrammation génétique de cellules adultes et peuvent donner plus de 200 types cellulaires représentatifs de tous les tissus de l'organisme.

Les cellules souches totipotentes proviennent d'un œuf fécondé de moins de 4 jours et constituent les cellules embryonnaires. La totipotence signifie « tout pouvoir ». Ce sont les seules cellules capables de se différencier vers toutes les lignées cellulaires et de se structurer pour former un organisme complet.

Le principe de différenciation est résumé dans la figure ci-après :

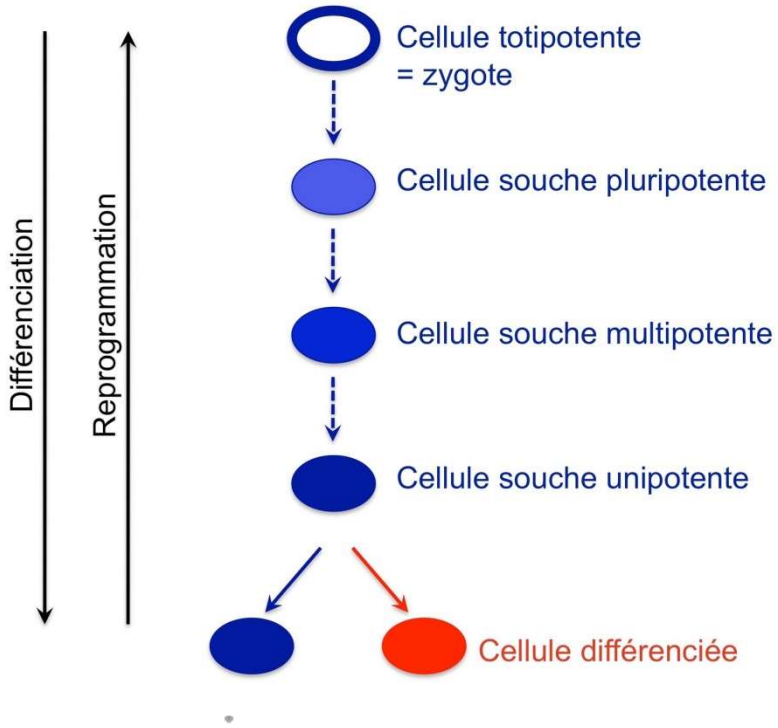


Fig.10 : les cellules souches, la différenciation cellulaire (Albert Barrois : les basiques de la thérapie cellulaire).

B-3 : Les organoïdes

Le terme organoïde signifie « qui ressemble à un organe ». Les organoïdes sont en fait des cultures cellulaires mais non plus en 2D mais en 3 D, dérivées de cellules souches, de cellules primaires ou de cellules progénitrices peu différenciées qui, à une échelle beaucoup plus petite, recréent les fonctions tissulaires de leurs homologues physiologiques. Une cellule progénitrice est issue d'une cellule souche multipotente, ne présentant pas encore de différenciation mais qui, en quelques divisions, donnera naissance à une ou plusieurs lignées cellulaires. Contrairement à une cellule souche, la cellule progénitrice ne présente pas de capacité d'autorenouvellement.

La fonctionnalité 3D révèle des fonctionnalités et des caractéristiques génétiques plus proches du vivant par rapport à une culture classique en boîte de Pétri.

Les organoïdes se définissent par 3 caractéristiques :

- les cellules s'auto-organisent in vitro en une structure tridimensionnelle caractéristique de l'organe in vivo (30),

- la structure résultante est constituée des multiples cellules présentes dans cet organe en particulier (31),

- les cellules exécutent au moins certaines fonctions qu'elles exerceraient dans cet organe.

Si l'organisation peut se faire de manière spontanée, on peut la stimuler et l'orienter par des forces mettant l'organoïde en mouvement, par le choix de la matrice (hydrogel, environnement cellulaire poreux...) ou par des facteurs de croissance et de différenciation choisis (nature, quantité, fenêtre d'exposition).

Par exemple, pour l'obtention d'un organoïde intestinal, la génération d'un endoderme définitif (feuillet à l'origine de l'épithélium du tube digestif) est possible par l'activation de la voie Nodal sous l'effet de l'Activine A (32).

La figure ci-après schématise le processus.

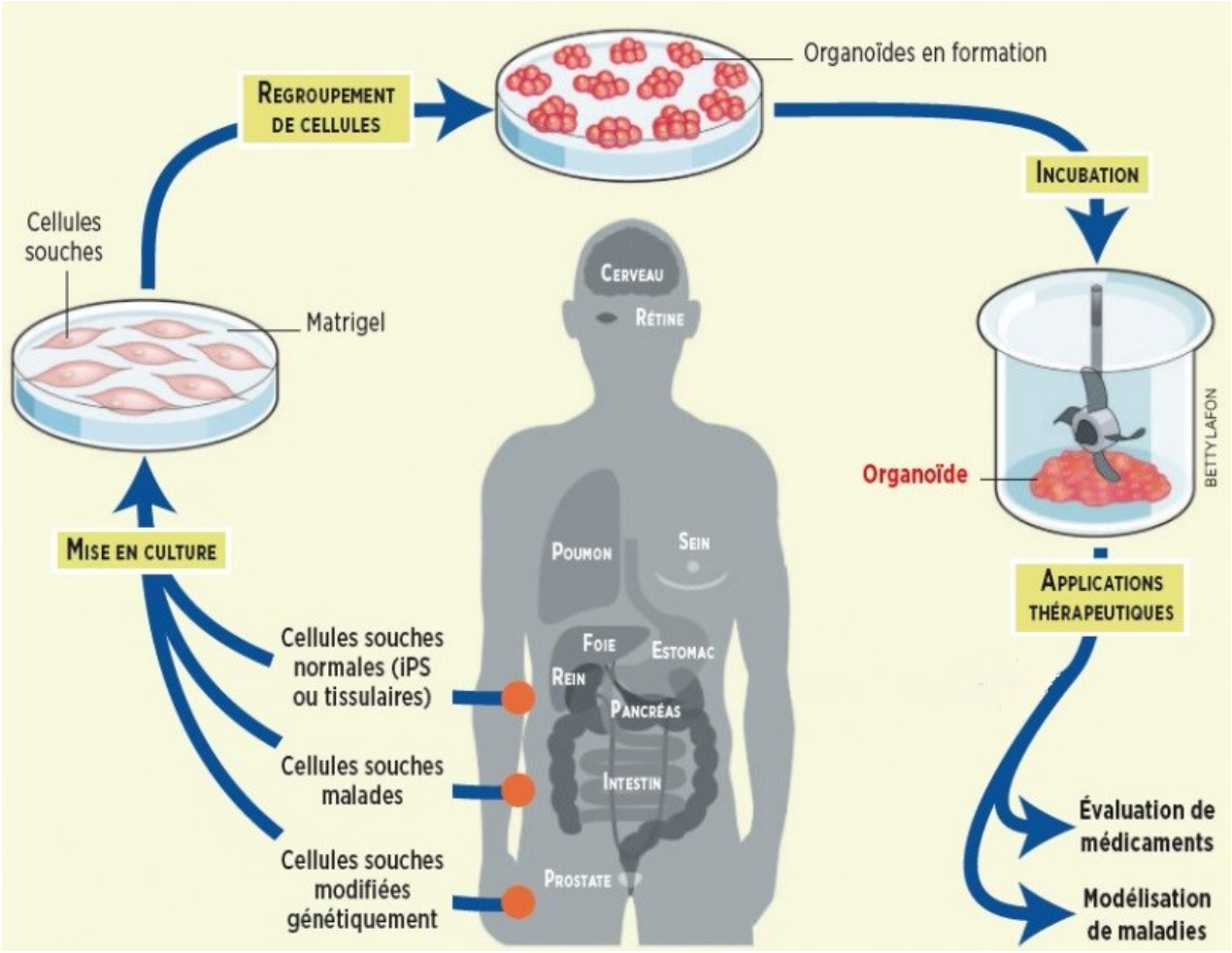


Fig.11 : des cellules souches aux organoïdes (©Betty Lafon / Sciences et Avenir).

Les organoïdes ont vu le jour au début du XXème siècle lorsque quelques chercheurs ont voulu reproduire l'organogenèse en culture (33), mais les véritables débuts datent des années 1970 avec les travaux de Howard Green et all. qui ont démontré qu'il était possible de cultiver in vitro des associations de kératinocytes et de fibroblastes humains ressemblant à de l'épiderme (31).

Cependant, les organoïdes présentent des limites. En effet, un organoïde n'a ni toutes les propriétés, ni toutes les fonctions d'un organe en tant que tout, dans la mesure où ils ne contiennent ni tous les types cellulaires ni toutes les structures (vaisseaux sanguins en particulier, innervation) nécessaires au fonctionnement d'un organe observable in situ. On ne peut donc pas parler d'un « mini organe ».

D'un point de vue éthique, les organoïdes amènent de nombreuses questions. Les cellules initiales provenant de donneurs, se pose la question de l'obligation réglementaire, du degré de consentement et d'information de celui-ci. Qu'en est-il de la propriété des organoïdes issus de ces cellules et des bénéfices financiers et technologiques qu'ils génèrent ? La protection des données de santé est également mise en cause puisqu'il y aura des analyses génétiques. Quel statut moral appliquer à ces organoïdes notamment quand on considère un gastruloïde qui est une culture de cellules d'embryon, ou encore un cérébroïde : les cellules

cultivées pourraient posséder des propriétés pertinentes pour la sensibilité et dans ce cas être plus que des cellules en culture (34). Il serait également possible de créer des chimères par xénotransplantation afin d'assurer vascularisation et innervation.

A ce stade, aucune norme ne régit les organoïdes quant à leur statut. Mais il est intéressant de noter qu'à l'issue des manipulations certains chercheurs parlent de « *sacrifice* » comme on le fait pour les animaux.

En conclusion, les organoïdes sont une avancée technologique majeure, pleine de promesses. Ils ne vont pas supplanter la culture cellulaire en 2D car celle-ci reste nettement plus facile à mettre en place et est beaucoup moins onéreuse mais ils sont devenus des outils majeurs en recherche fondamentale et deviennent incontournables pour comprendre la toxicité et l'action d'une molécule thérapeutique. Ils se positionnent comme un outil supplémentaire et complémentaire des autres modèles in vitro et in vivo. « Les organoïdes ne pourront jamais être aussi représentatifs et complets que le modèle animal mais leur usage rendra la recherche animale plus efficace, précise et ciblée, ce qui diminuera le nombre d'animaux utilisés. » (35).

C- Les méthodes in vivo

Les méthodes in vivo sont principalement représentées par l'imagerie médicale qui s'est très largement développée ces dernières années :

- IRM,
- TEP,
- imagerie par rayons X,
- scanner,
- échographie.

C-1 : intérêt de l'imagerie médicale

Ces méthodes sont non invasives et permettent de suivre dans le temps un même animal dans le cas d'étude longitudinale et ainsi de contourner les difficultés d'interprétation des résultats liées aux différences individuelles telles le sexe de l'animal ou son poids par exemple. Elles permettent une diminution du nombre d'animaux nécessaires à un protocole expérimental car le sacrifice n'est pas nécessaire pour les appliquer.

L'imagerie donne accès à de nombreuses données anatomiques, physiologiques, voire moléculaires. En outre plusieurs techniques permettent maintenant d'obtenir des données phénotypiques des rongeurs transgéniques créés, évitant les dissections et permettant le perfectionnement dans l'élaboration des modèles.

Ces méthodes nécessitent toutefois l'adaptation des appareils aux différents formats des animaux et dans la majorité des cas, l'anesthésie ou la tranquillisation des animaux étudiés.

L'avantage de ces méthodes d'investigation est qu'elles ne génèrent pas de douleur chez l'animal de laboratoire.

C-2 : L'IRM

L'IRM (imagerie par résonnance magnétique) est une technique d'examen qui consiste à créer des images précises d'une partie du corps grâce à des ondes (comme des ondes radio) et à un champ magnétique. Elle repose sur le principe de résonnance magnétique nucléaire (RMN). Un champ magnétique surpuissant et stable, généré par un aimant supraconducteur, fait réagir un composant de notre corps : l'hydrogène, présent dans les molécules d'eau. Les noyaux d'hydrogène vont alors se mettre à vibrer. Au cours de ces vibrations, les protons contenus dans ces noyaux vont se comporter comme autant de petits aimants et vont émettre des signaux qui seront captés par une antenne puis transformés en image. Les images, sous forme de coupes, sont alors reconstituées par un ordinateur et pourront être interprétées par le spécialiste. On peut obtenir des vues en deux ou en trois dimensions. L'injection d'un produit de contraste peut s'avérer utile pour améliorer la qualité de l'image.

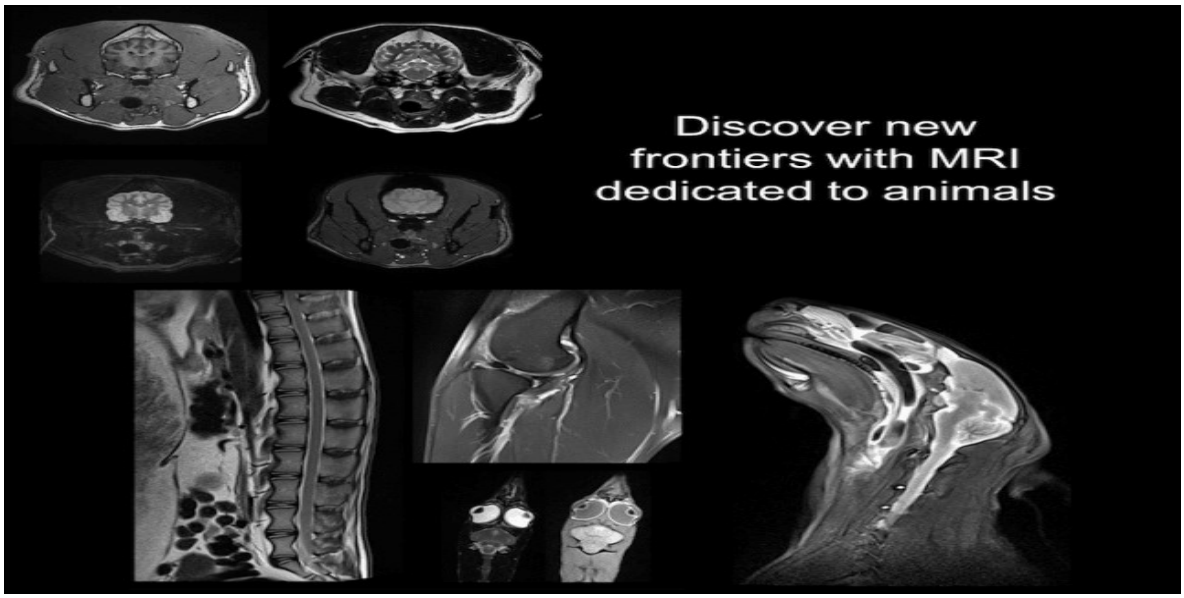


Fig.12 : exemples d'images IRM (UMIquiz).

L'IRM permet donc de visualiser les organes et tissus mous, avec une grande précision grâce à une résolution en contraste élevée, dans plusieurs plans de l'espace. On l'utilise principalement pour étudier des tissus tels le système nerveux central (cerveau et moelle épinière), les muscles, le cœur et dans la détection des tumeurs. En revanche cette technologie ne permet pas l'étude des corticales osseuses, tissus « durs », trop pauvres en hydrogène.

Cette technique exigeant une immobilité totale du patient au cours de son exécution, les animaux étudiés devront obligatoirement être sous anesthésie générale.

Fig.13 : exemple d'appareil IRM vétérinaire (© 2020 Randy Kepple Photographs)

C-3 : Le TEP, PET ou pet scan

TEP est en fait l'acronyme de tomographie par émission de positons (PET: positon emission tomography). Cette technique d'imagerie médicale repose sur le principe de la scintigraphie : on injecte par voie intra veineuse au patient un traceur dont on connait le comportement et les propriétés biologiques afin de visualiser le fonctionnement d'un organe ou la présence d'une cible moléculaire, à l'aide d'une caméra spéciale : la caméra TEP (voir figure 14). Ce traceur est marqué d'un atome faiblement radioactif, carbone, fluor, azote ou oxygène. Le plus souvent on utilise le fluor 18 incorporé à une molécule de glucose. Le traceur ainsi obtenu se comporte comme une molécule de glucose et se fixe aux cellules qui en consomment. Plus une cellule sera active, avec un métabolisme élevé, plus la concentration en traceur sera importante. On mesure donc l'activité métabolique d'un organe grâce à la concentration en traceur en chacun de ses points. Les cellules tumorales étant plus actives, elles consomment et fixent davantage le glucose.

On parle dans ce cas d'imagerie fonctionnelle.

C'est donc un examen de choix pour la détection et le suivi des tumeurs. Le tissu neurologique et le muscle cardiaque étant également de gros consommateurs de glucose, ils sont également de bons sujets d'étude. Historiquement la TEP a d'abord été utilisée pour la recherche en neurologie (36).

L'exposition aux radiations est mineure. En effet la demi-vie du fluor 18 est de 110 mn et on peut donc considérer que la quasi-totalité de la radioactivité a disparu en 12h voire même plus rapidement puisque le fluor non fixé sera éliminé dans les urines, urines qu'il faudra alors veiller à récolter et à traiter de manière adéquate. La quantité de radioactivité est directement liée à la dose injectée et donc au poids du patient.

L'imagerie tomographique permet d'obtenir sur un seul et unique animal des images 2D ou 3D et ce, sans porter atteinte à son intégrité physique (hormis l'anesthésie et, pour certaines modalités, l'injection d'un traceur ou d'un agent de contraste). Cet aspect non invasif de l'imagerie autorise un suivi dans le temps d'un même animal.

La figure 14 nous résume le processus d'acquisition d'une TEP.

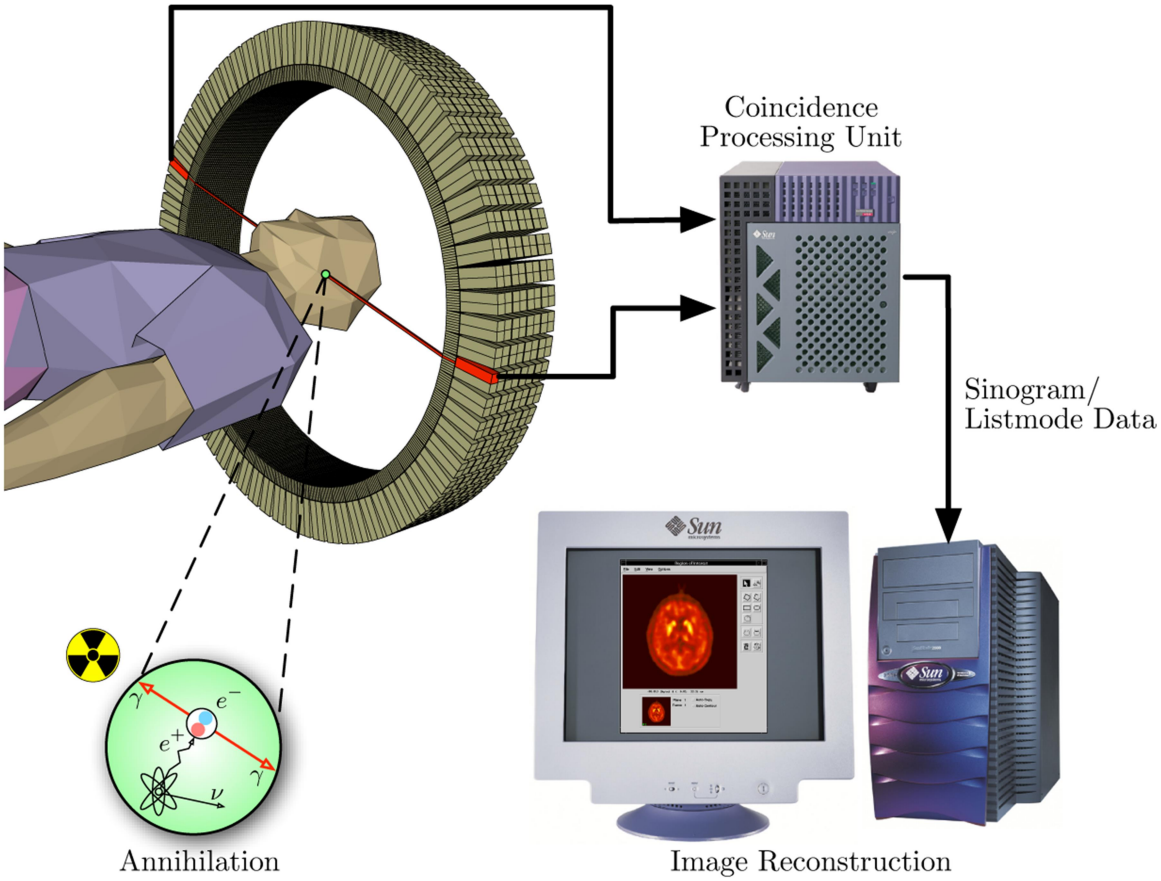


Fig.14 : schéma du processus d'acquisition d'une TEP (TEL archives ouvertes).

C-4 : L'imagerie par rayons x

Les rayons X ou radiographie constituent probablement la technique d'imagerie médicale la plus ancienne. Sa découverte date de la fin du XIXème siècle (1850) par le physicien allemand Röntingen, ce qui lui valut le prix Nobel de physique. Les rayons X sont des ondes électromagnétiques de hautes fréquences, de l'ordre de 10^6 Hz à 10^{20}Hz, comme représenté en figure 15, qui ont la propriété de traverser la matière condensée (solides et liquides) en étant partiellement absorbés.

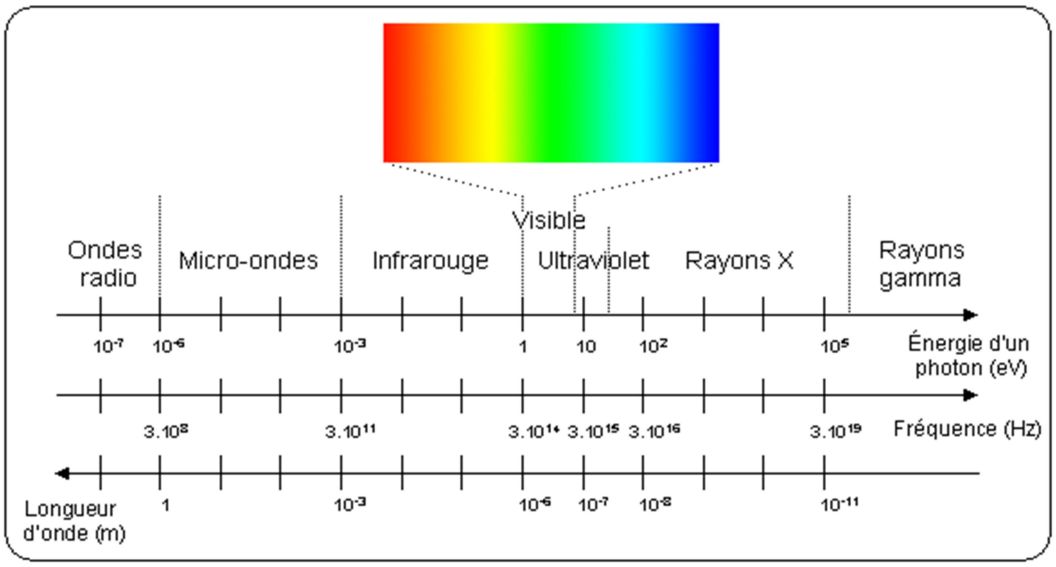


Fig.15 : spectre électromagnétique (Rayons X dans l'imagerie médicale-E-monsite)

Ils sont produits dans des tubes à rayons X appelés tubes de Coolidge ou tubes à cathode chaude. En imagerie médicale, le faisceau de rayons est émis en direction de la zone du corps à examiner, les électrons émis par la cathode (en général un filament de tungstène chauffé) sont accélérés par une différence de potentiel élevé, en direction de la cible (anode en métal). L'intensité est modulée par l'absorption différentielle des organes traversés. L'image est ensuite recueillie sur un récepteur. Le coefficient d'atténuation dépend de la composition chimique des tissus : il est élevé pour les os, moyen pour les tissus mous et faible pour la graisse. En effet l'absorption des rayons X dépend de la nature des atomes : plus leur numéro atomique est élevé plus elle sera importante. Comme les os contiennent des sels minéraux (phosphore, calcium, magnésium) avec un numéro atomique élevé, ils absorbent plus de rayons que les tissus mous constitués d'éléments ayant un numéro atomique plus faible (oxygène, carbone, hydrogène, azote...).

La radiologie conventionnelle ne détecte que des contrastes supérieurs à 4%. Lorsque celui-ci est insuffisant on utilise des produits contrastants tels l'iode ou le sulfate de baryum.

Suivant leur puissance, les rayons X pourront être utilisés pour réaliser des examens médicaux (radiologie) ou des traitements (radiothérapie).

Les rayons X sont des radiations ionisantes. Une exposition prolongée ou répétée peut entraîner des brûlures ou des cancers. Des précautions sont donc à prendre. Le personnel utilisant ces appareils doit avoir suivi une formation spéciale, porter des vêtements de protection adaptés (tabliers, gants, lunettes, protège thyroïde) et contrôlés régulièrement, porter des dosimètres. Les zones d'émissions doivent clairement être délimitées et signalées et les locaux utilisés doivent répondre aux normes en vigueur (directive eurotom (97-43)).

La limite principale de ces techniques utilisant les rayonnements ionisants réside dans l'irradiation reçue par les animaux, qui peut réduire la durée du suivi longitudinal.

C-5 : le scanner

Le scanner encore appelé tomodensitométrie est un examen qui consiste à réaliser des images en coupes fines puis à les reconstituer à l'aide d'un ordinateur.

Le principe de la tomodensitométrie repose sur le théorème de Radon qui décrit comment il est possible de reconstruire la géométrie bidimensionnelle d'un objet à partir d'une série de projections mesurées tout autour de lui. Cette méthode peut être étendue à la tomographie interne d'un objet. Il aura fallu attendre le début des années 70 et l'apparition d'ordinateurs capables de reconstruire les images par des calculs complexes pour voir apparaître les premiers appareils. C'est le britannique Godfrey Newbold Hounsfield (37), d'après les travaux de l'américain Allan MacLeod Cormack qui en fut le créateur (38). Les deux savants ont d'ailleurs obtenu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1979.

La technologie du scanner fait appel aux rayons X mais, contrairement à la radiographie, le tube générateur de rayons ne reste pas fixe mais tourne autour du patient : on soumet le patient à un balayage de rayons X. Les données sont alors traitées informatiquement pour recomposer des vues bidimensionnelles puis tridimensionnelles des organes.

Fig.16 : exemple de scanner (les tumeurs cérébrales E-monsite)

On peut faire ressortir le contraste de certains tissus à l'aide de produit de contraste à base d'iode qui absorbe fortement les rayons X. Ce produit peut être administré par voie veineuse, orale ou par voie rectale.

Les appareils modernes, scanners spiralés ou hélicoïdaux, permettent d'effectuer les examens beaucoup plus rapidement et avec une meilleure qualité. Leur usage chez les animaux nécessite une anesthésie générale.

Utilisant la technologie des rayons X, leurs inconvénients sont les mêmes mais le faible taux d'irradiation en fait malgré tout une technique de choix.

Le scanner permet, par exemple, de visualiser chez les rongeurs les organes intra-thoraciques, des lésions osseuses d'arthrite rhumatoïde ou des métastases osseuses.

C-6 : L'échographie

L'échographie est une méthode d'exploration non invasive permettant d'obtenir des images de l'intérieur du corps, *en direct*. Sa technologie repose sur l'utilisation d'ultrasons, à l'instar du sonar mis au point pour détecter et localiser des objets sous l'eau. Cette technologie était surtout utilisée par les industriels pour détecter les problèmes au niveau des coques de bateaux ou des carrosseries de voitures.

Les premières expérimentations dans le domaine médical remontent aux années 1930, mais c'est à partir des années 1950 que des avancées majeures virent le jour. La première échographie fut publiée en 1952 par le britannique John Wild. En 1958, l'obstétricien Ian Donald publia un article fondateur dans le domaine de l'échographie médicale en gynécologie et dévoilât les premières images 2 D d'un fœtus.

Le principe de l'échographie repose sur des ultrasons envoyés par une sonde, dans un périmètre restreint. Les obstacles rencontrés (les organes) renvoient des échos qui sont enregistrés et traduits en image. On peut faire varier la fréquence de ces ultrasons pour obtenir des images plus ou moins précises. Plus la fréquence est élevée plus l'image est « fine » mais on perdra alors en profondeur car les ondes seront rapidement amorties. Les fréquences utilisées vont de 1,5 (usage courant pour le secteur profond) à 50 MHz (biomicroscopie). En recherche animale, on utilise le plus souvent des fréquences de 10 à 18 MHz.

Les échos renvoyés varient suivant l'aptitude des organes à rétrodiffuser les ultrasons, c'est ce qu'on appelle l'échogénicité.

Le contact entre la sonde et la zone de peau choisie n'est jamais parfait, et la fine couche d'air qui persiste entraîne une atténuation conséquente du signal. Pour remédier à cette atténuation, on applique un gel dont l'impédance acoustique est proche de celle de la peau.

Un échographe se constitue de :

- une sonde permettant l'émission et la réception des ultrasons,

- un système informatique permettant de transformer les délais entre émission et réception des ultrasons en image,

- une console pour la saisie des informations et les réglages,

- un écran de visualisation (moniteur),

- un système d'enregistrement des données (figure17).

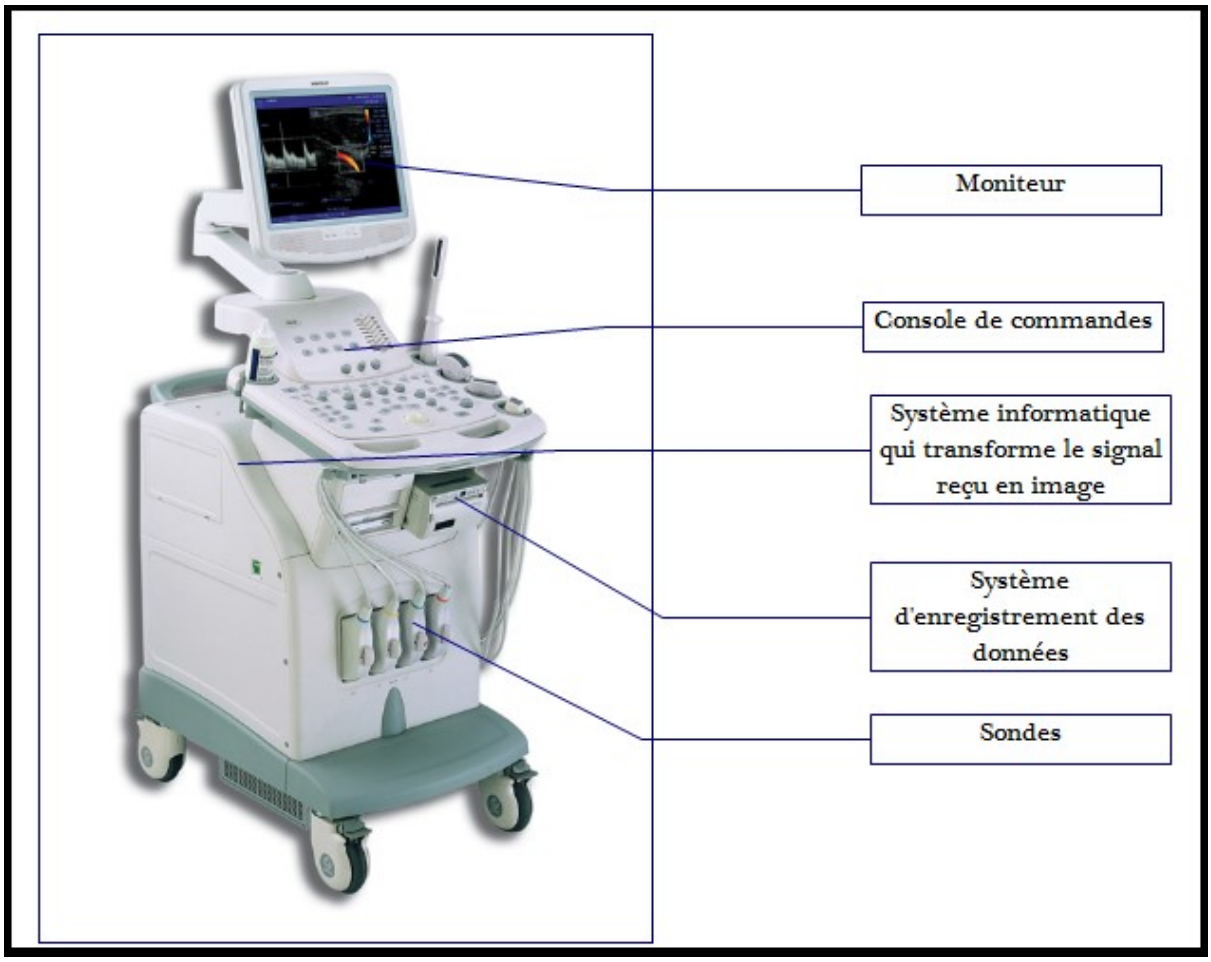


Fig. 17 : description d'un échographe (TPE rayons x et échographie- E-monsite)

Les images reçues sont dans une gamme de gris suivant l'échogénicité des tissus :

- les liquides simples, sans particules en suspension, laissent passer les ultrasons. Il n'y a donc pas d'écho, l'image apparaîtra noire,

- les liquides avec particules (sang, mucus...) renvoient des petits échos, ils apparaîtront dans les tons gris,

- les structures solides (os) renvoient mieux les échos, elles apparaissent blanches (hyperéchogène) avec une ombre derrière (cône d'ombre).

Cet examen peut être couplé à un Doppler qui permet d'encoder en couleur des éléments circulants se déplaçant à l'intérieur d'un organe. Ce qui en application pratique,

s'utilise dans l'immense majorité des cas pour étudier la circulation sanguine au sein des organes ou la vascularisation de certaines lésions.

L'échographie est donc une méthode d'imagerie non douloureuse, peu invasive et ne nécessitant pas forcément une anesthésie générale, une simple contention pouvant suffire surtout si les sujets à étudier ont été habitués aux manipulations. Mais elle reste difficile à mettre en place pour les petits rongeurs (manipulation, taille des sondes...).

C-7 : La bioluminescence

La bioluminescence est la production et l'émission de lumière par un organisme. Dans la nature, peu d'espèces utilisent la bioluminescence (1% des êtres vivants), et essentiellement dans les milieux extrêmes (90% des organismes des mers profondes, poulpes, méduses...) (39).

Elle est due à l'émission de photons par une molécule organique (substrat) excitée à la suite d'une réaction d'oxydation catalysée par une enzyme. Le substrat est capable de traverser les membranes cellulaires et les barrières cérébrales et placentaires, ce qui permet une imagerie de tout l'organisme. L'intensité du signal dépend de la longueur d'onde, de l'enzyme utilisée (luciférase de luciole en général) et de son taux d'expression, comme figuré ci-dessous.

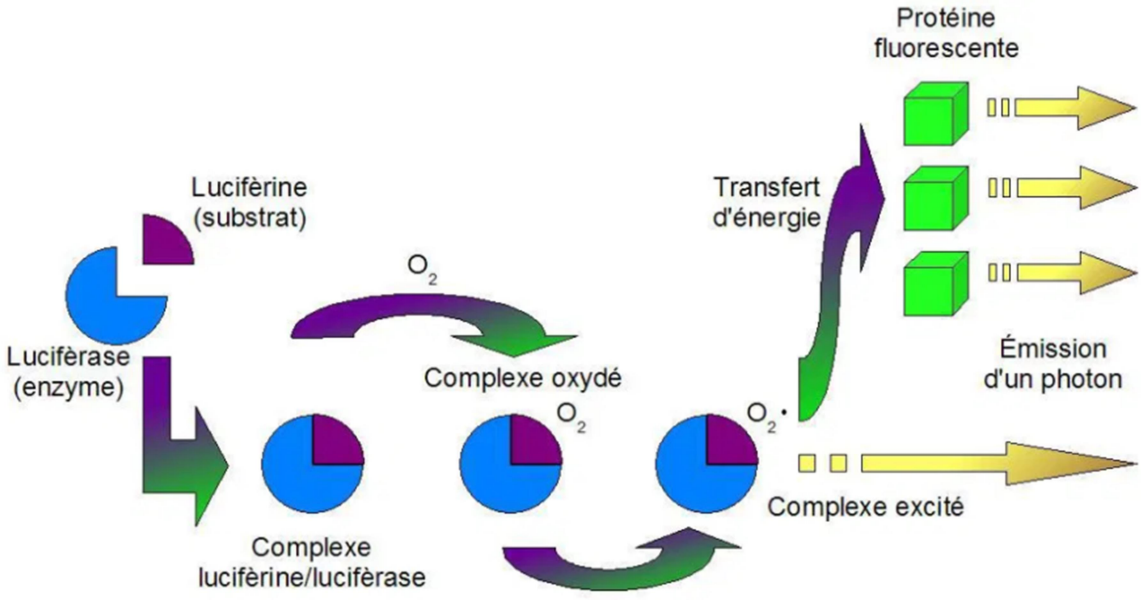


Fig.18 : principe de la bioluminescence (Futura- sciences)

Le substrat utilisé est la luciférine et l'enzyme servant de catalyseur pour l'oxydation, la luciférase. Le substrat est parfois préalablement activé par apport d'énergie sous forme d'ATP.

Après injection de cellules bioluminescentes, sous anesthésie générale, l'animal peut être imagé plusieurs fois si nécessaire. On utilise pour la visualisation une caméra hautement performante équipée d'un capteur CCD (Charge Coupled Device).

C'est donc une technologie qui permet une visualisation en temps réel, avec une grande sensibilité et de façon non invasive des lésions type tumeur, in vivo, sans sacrifice animal.

La figure 19 nous présente des exemples de suivi de développement de tumeurs dans des tissus profonds (40).

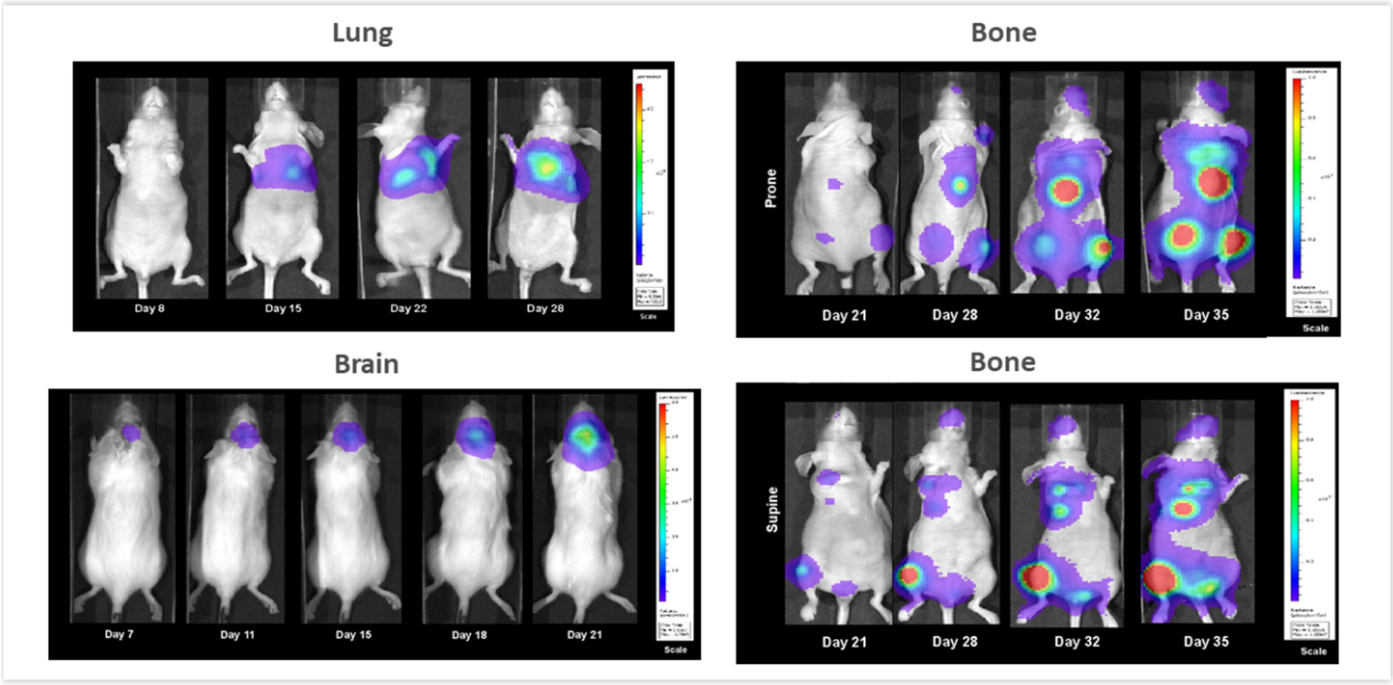


Fig.19 : Images de BLI représentatives de différents modèles in vivo (covance).

En haut à gauche, le carcinome pulmonaire humain NCI-H460-Luc2 implanté en OT (poumon gauche) chez des souris nude femelles. En bas à gauche, gliome syngénique murin GL261-luc2 implanté en OT dans le cerveau de souris albinos C57BL/6 femelles et en bas à droite, lésions osseuses de tumeur mammaire humaine MDA-MB-231-luc-D3H2LN après injection intracardiaque chez des souris nude femelles montrant des images du corps entier en position couchée sur le ventre (haut) et couchée sur le dos (bas).

D : Les méthodes in silico

D-1 : Les modèles informatiques

En recherche expérimentale, les modèles informatiques sont désignés par les termes SAR ou QSAR : (Quantitative) Structure- Activity Relationships ou « systèmes experts ».

Les SAR représentent une relation entre la structure d'un composé ou d'une classe de composés et un effet biologique. Ils donnent une réponse de type oui ou non (réponse qualitative).

Les QSAR utilisent des modèles mathématiques plus complexes et génèrent des réponses plus complètes (réponse quantitative).

« Les modèles (Q)SAR sont des modèles mathématiques pouvant être utilisés pour prédire les propriétés physicochimiques, biologiques et de devenir dans l'environnement des composés à partir des connaissances relatives à leur structure chimique »(41). Il s'agit de relier des propriétés moléculaires microscopiques appelées descripteurs, à un effet expérimental (activité biologique, toxicité, affinité pour un récepteur) par des méthodes d'analyse de données.

Les descripteurs théoriques se déclinent en plusieurs sous-classes :

- les constitutionnels (composition chimique),

- les topologiques (structure bidimensionnelle),

- les géométriques (structure tridimensionnelle),

- les quantiques (structure électronique).

Les bases de données de ces modèles sont fournies par les études menées in vivo, in vitro, ou par les observations obtenues lors d'essais cliniques. Le choix de la base des données expérimentales de référence est décisif : ces données doivent être fiables, obtenues en suivant un protocole expérimental unique et reconnu.

Toutes ces informations sont reliées par des corrélations statistiques aux informations structurales telles les régressions multilinéaires (MLR), les régressions aux moindres carrés partiels (PLS), les arbres de décisions, les réseaux de neurones et les algorithmes génétiques.

En pratique, il faut donc pour mettre en place un modèle :

- définir la base de données,

- définir les différents prescripteurs des composés étudiés,

- choisir les outils d'analyse.

Une fois le modèle développé, sa corrélation doit être validée sur le jeu d'entraînement. Sa robustesse, c'est-à-dire l'influence des jeux d'entraînement sur le modèle, est estimée par des méthodes de validation internes. Et enfin, il faudra estimer son pouvoir prédictif avec des données expérimentales supplémentaires.

Il est primordial pour la validité du (Q)SAR de bien choisir le domaine d'applicabilité, c'est à dire de corréler la molécule à étudier avec le bon modèle.

La relation (Q)SAR ainsi mise en place pourra alors être utilisée pour la prédiction d'un jeu de nouvelles molécules, existantes physiquement ou non, pour lesquelles les valeurs expérimentales n'existent pas. L'utilisation de ces modèles est gratuite ou sous forme de logiciels commerciaux.

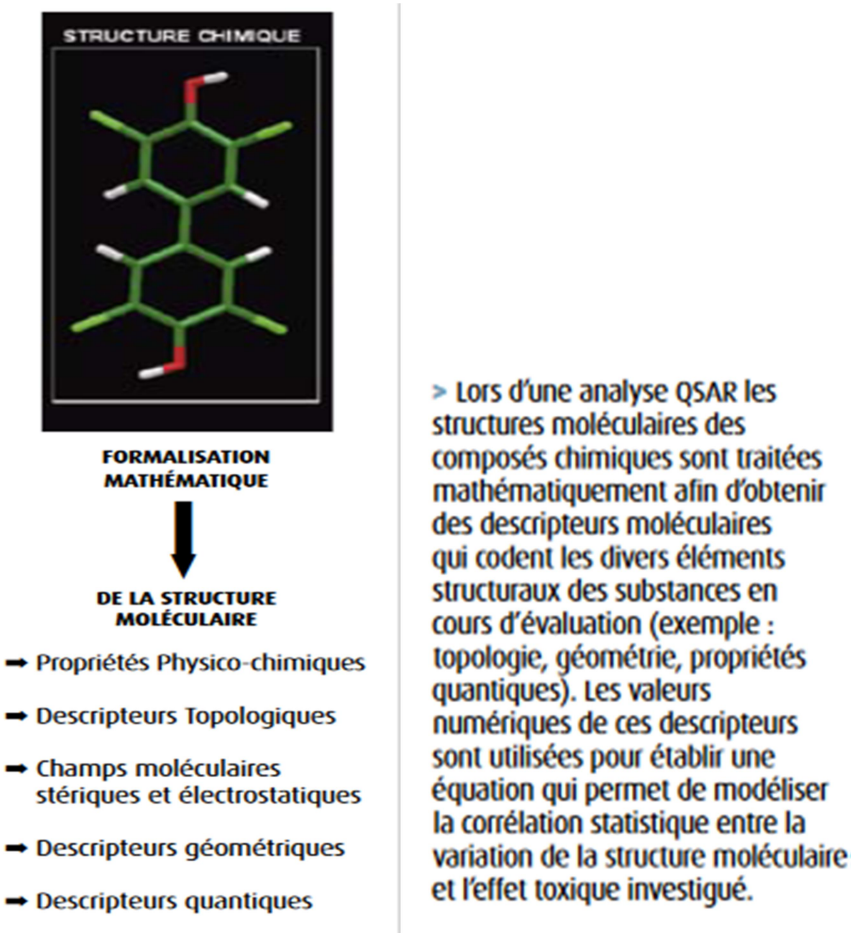


Fig.20 : E.Montebelli, la modélisation du QSAR (HAL Ineris)

D-2 : applications

Dans la pratique ces méthodes sont couramment utilisées par les industries pharmaceutiques pour tester la toxicité des matières premières, des additifs alimentaires ou pour l'élaboration de médicaments grâce entre autre au programme CADD : Computer Aided Drugs Discovery, (conception de médicaments assistée par ordinateur).

A un stade précoce des recherches, elles permettent un criblage des molécules (screening) afin de n'étudier que les molécules les plus prometteuses en matière d'efficacité et d'innocuité. Elles permettent également de trouver les dérivés possibles qui amélioreraient l'activité, grâce à des filtres qui permettent d'éliminer les composés avec des propriétés telles que faible activité et/ou mauvaise absorption, distribution, métabolisme, excrétion et toxicité.

Le métabolisme et la pharmacocinétique des médicaments peuvent être améliorés par l'optimisation des composés principaux grâce au screening. De plus, le risque de résistance peut être diminué en ciblant plus précisément le facteur causal.

Le nombre d'expérimentations traditionnelles sur modèles animaux pourra être minimisé : un rapport de l'ECB (*European Chemicals Bureau*) suggère que l'utilisation optimale des méthodes *in silico* dans le cadre de REACH pourrait diminuer les besoins en animaux de laboratoire de 1,9 à 1,3 millions (42).

Ce programme permet également de mieux déterminer le dosage optimal d'un principe actif et de tester les effets secondaires sur des récepteurs humains.

D-3 : limites des méthodes in silico

Comme toute méthode, les méthodes in silico présentent des limites. Deux causes principales sont à l'origine de ces limites.

Les méthodes in silico ne tiennent pas compte des modifications ou des variations possibles dans le milieu in vivo. La prédictivité est limitée concernant le potentiel de toxicité chronique, le potentiel cancérigène ou la toxicité sur le processus de reproduction. En outre ces phénomènes font intervenir un nombre conséquent de variables et de mécanismes. De plus, la généralisation d'un modèle QSAR pour la modélisation de catégories moléculaires hétérogènes, entraîne une perte de spécificité par rapport à la capacité à discriminer les molécules toxiques des molécules inoffensives. Enfin, la plupart des modèles QSAR ne peuvent pas modéliser la toxicité de mélanges chimiques. Des études sont faites en ce sens pour prendre en compte les phénomènes de synergie ou d'antagonisme (43).

La seconde limite des modèles informatiques vient des banques de données. En effet, pour avoir un modèle sûr, celui-ci doit s'appuyer sur un grand nombre de données qui doivent

être absolument fiables, obtenues à partir de protocoles expérimentaux reconnus et validés scientifiquement. « *Il est difficile de comprendre la nature des nombreuses interactions (d'éléments simples), essentielles pour la santé ou la maladie, sans une compréhension biophysique plus poussée des règles d'auto-assemblage des molécules biologiques, de leurs interactions quantitatives et de leurs mécanismes de contrôle basés sur les lois de reconnaissance moléculaire non encore entièrement comprises.* » (44).

C'est pourquoi, il est important d'inciter tous les acteurs du secteur à participer et partager leurs résultats d'expérience afin de créer des banques de données au niveau national, européen et international.

E-Les organes sur puce

E-1 : Définition

Un organe sur puce est un système miniaturisé dans lequel sont creusés des canaux micro fluidiques selon une architecture appropriée. Le squelette de ce système, typiquement de la taille d'une carte de crédit, est appelé « puce ».

La microfluidique est la science et la technologie des systèmes qui manipulent de petits volumes de fluides (10^{-9} à 10^{-18} litres), en utilisant des canaux de la dimension de quelques dizaines de micromètres (45).

Un organe sur puce mime la fonction d'un organe, alors qu'une culture cellulaire a pour vocation de répliquer un organe. Par rapport à un organoïde, où les cellules souches se différencient progressivement et s'auto-organisent selon les lois qui les régissent, sur un organe sur puce les cellules sont placées sciemment et leur développement est contrôlé.

Nous pouvons voir un organe sur puce en figure 21.

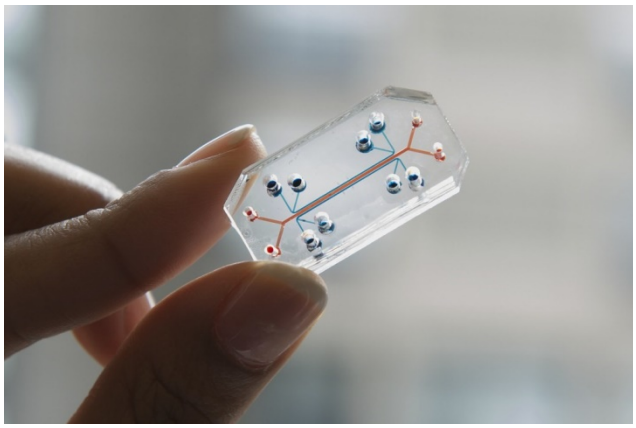


Fig.21 : organe sur puce (Elveflow)

Les dispositifs microfluidiques permettent aux cellules de conserver leurs caractéristiques fonctionnelles durant plusieurs semaines.

Ces dispositifs intègrent directement des cellules humaines ce qui constitue un avantage certain par rapport aux modèles animaux.

E-2 : Historique

Le premier organe sur puce a été mis au point aux Etats-Unis en 2010 par le biologiste Donald Ingber (46) et son équipe de l'institut Wyss, qui ont travaillé sur une reproduction du poumon. Ils ont adapté les méthodes de fabrication de micropuces informatiques pour concevoir des dispositifs de culture microfluidique qui récapitulent la microarchitecture et les fonctions d'organes humains vivants. Le poumon sur puce reproduit l'interface entre un capillaire sanguin et une alvéole pulmonaire en utilisant deux microcanaux, séparés par une membrane poreuse recouverte sur chaque face de molécules permettant l'adhésion des cellules, vasculaires d'un côté, pulmonaires de l'autre. Une chambre à vide située de part et d'autre des canaux permet d'exercer une force de succion qui déforme les parois comme au cours d'un cycle respiratoire. L'organe sur puce « respire » comme le montre la figure 22.

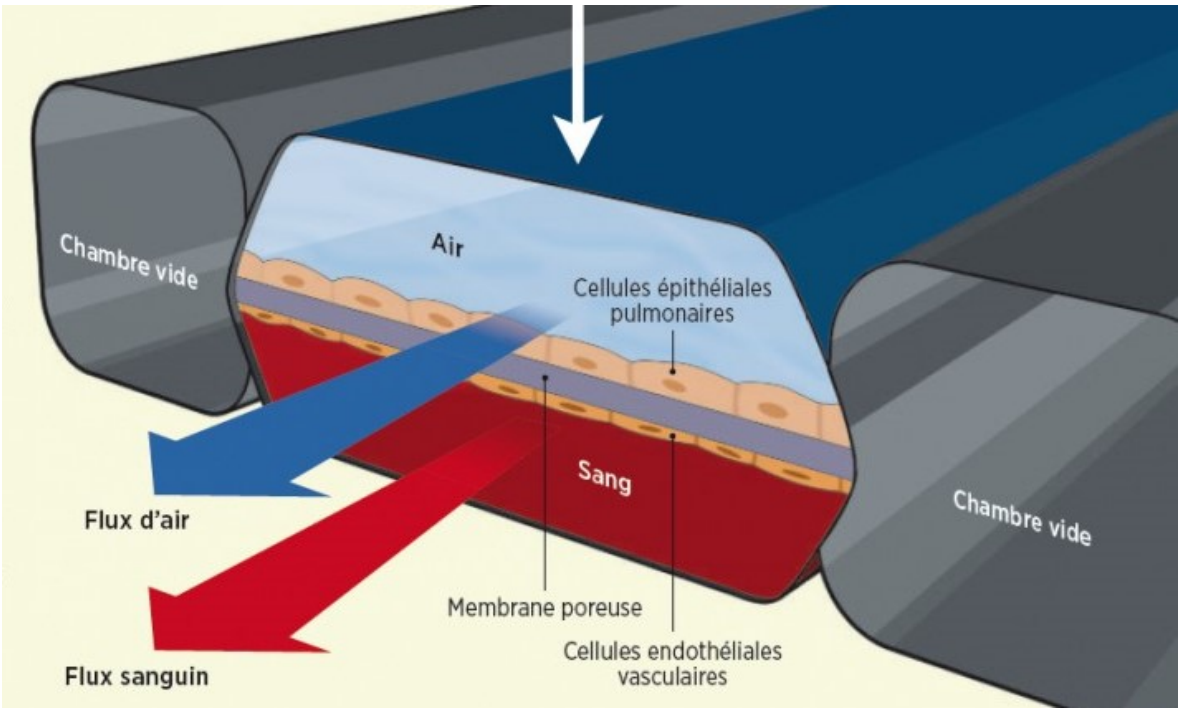


Fig.22 : poumon sur puce (Betty Lafon/sciences et avenir)

E-3 : Applications

A l'heure actuelle, il existe de nombreux organes disposant d'une réplique sur puce : le cœur (avec des cellules cardiaques humaines stimulées par des microélectrodes électriques et une micro pompe faisant circuler un liquide de perfusion), le foie, le rein, l'os, la moelle osseuse, le tissu graisseux, l'intestin, la peau, les vaisseaux sanguins, la barrière hémato-méningée.

Le rôle du foie étant fondamental dans le métabolisme de la plupart des agents chimiques, le foie sur puce devient alors un outil de choix pour déterminer la toxicité d'une molécule. Cependant, il peut également générer des dérivés toxiques pour d'autres organes tels les reins. Dans ce cas, des puces associant foie et reins sont les dispositifs les plus adaptés pour la détection de la toxicité des molécules.

La première application de ces organes sur puce est donc dans la recherche pharmaceutique, qui pourrait s'affranchir alors de l'expérimentation animale car les molécules sont directement testées sur des cellules humaines, donnant une meilleure évaluation des effets que si on utilisait un modèle animal dont la réponse peut être différente.

Les organes sur puce permettent également une personnalisation de la recherche sur une maladie en particulier (la mucoviscidose par exemple) ou sur un groupe de patients

(utilisation de types cellulaires tels les cellules iPS du patient atteint d'une pathologie spécifique).

L'avenir des organes sur puce repose sur deux axes à l'heure actuelle :

- le développement d'organoïdes sur puce (CEA de Grenoble),

- le « Body on a ship », approche holistique des américains qui essaient de connecter plusieurs organes sur puce entre eux afin d'obtenir un corps humain entier sur puce.

Ils pourraient également permettre de restaurer les fonctions d'un organe en attendant une greffe (ex : diabète de type 1 : greffes d'îlots de Langerhans élevés sur puce).

L'Union Européenne, avec son projet ORCHID (Organ on a CHIp in Development) compte établir une feuille de route pour le développement des organes sur puce et l'établissement via EUROoCS (European Organ-on-Chip Society) d'une plateforme de dialogue et de communication entre les développeurs, les sociétés qui commercialisent les organes sur puce, les utilisateurs et les régulateurs. Les plans prévoient la création de centres indépendants de test des organes sur puce afin d'évaluer leur performances techniques, leur compatibilité biologique, leur solidité et leur reproductibilité.

E-4 : Les limites des organes sur puce

Les limites des organes sur puce sont d'ordre technique. En effet, le support utilisé à l'heure actuelle est un polymère PDMS (polydiméthylsiloxane) qui a la particularité d'absorber certains composés organiques et certains gaz ce qui peut modifier les interprétations.

Les chercheurs travaillent également à l'élaboration d'un substitut de « sang universel » comme milieu de culture unique. En effet, la nature et la composition du fluide irrigant les cellules varient d'un dispositif à l'autre.

Les techniques de simulation actuelles ne peuvent pas encore s'appliquer au système nerveux, immunitaire, aux réactions endocriniennes et aux troubles squelettiques. *« Étant donné la complexité du fonctionnement de chaque organe et les contraintes réglementaires, il est peu probable que ces dispositifs remplacent tous les tests sur les animaux dans un avenir proche »*, observe le Pr Donald Ingber.

Partie III : Vers un 4ème et 5ème R : réhabilitation/réutilisation et responsabilisation/respect

A : La réhabilitation

A-1 : Définition

La réhabilitation consiste à offrir aux animaux arrivés en fin de protocole expérimental, si leur état physiologique et psychologique le permet, une alternative éthique à l'euthanasie. Il s'agit donc soit de les faire adopter par des particuliers (animaux domestiques tels que chiens, chats, petits rongeurs, chevaux) soit de les placer dans des centres spécialisés, et cela concerne les animaux d'élevage ou de la faune sauvage (animaux de rente, primates non humains, poissons).

On parle également de « Rehoming »: retour à la maison.

A-2 : Législation

La réhabilitation s'inscrit dans un cadre éthique et légal en France. Suite logique de la règle des 3 R(6), la réhabilitation des animaux de laboratoire est autorisée par les textes, notamment par les articles R-214-87 et R-214-89 du code rural. Elle est intégrée en tant que 4ème R à la directive européenne sur l'expérimentation animale : « *au terme de la procédure, il convient de prendre la décision la plus appropriée quant au sort de l'animal, en fonction de son bien-être et des risques potentiels pour l'environnement. Il y a lieu de mettre à mort les animaux dont le bien-être serait compromis. Dans certains cas, il convient de relâcher les animaux dans un habitat ou un système d'élevage approprié, ou d'autoriser le placement des animaux comme les chiens et les chats dans des ménages, car l'opinion publique se préoccupe grandement de leur sort »* (47).

A la fin d'une procédure, c'est le vétérinaire ou une personne légalement reconnue comme compétente qui décide si l'animal peut être gardé en vie et faire l'objet d'une réhabilitation telle que l'adoption.

A-3 : Les enjeux

Les enjeux de la réhabilitation des animaux de laboratoires sont essentiellement éthiques. En effet, le bien-être animal est devenu un problème sociétal majeur à l'heure d'internet et des réseaux sociaux où nombre d'articles et de pétitions circulent. Le public dans sa grande majorité, alerté par les associations de protection animale, est hostile à l'expérimentation sur des animaux vivants, doués de conscience et de sensibilité comme le prouvent les derniers sondages IFOP effectués :

- 90% des français sont favorables à l'interdiction de l'expérimentation animale si des méthodes substitutives existent (48), soit 5 points de plus qu'en 2003 (49),

- 73% demandent l'interdiction de toute expérimentation animale sur nos animaux de compagnie (50),

- 51% désapprouvent toute expérimentation sur les chiens et les singes, même si cela peut améliorer la santé humaine (51).

Il y a une prise en considération croissante de la souffrance animale, mais pas seulement par le grand public. Les chercheurs sont de plus en plus soucieux du bien-être des animaux qu'ils utilisent, et font preuve de compassion. Il est à noter que certains d'entre eux pratiquaient déjà la réhabilitation à petite échelle, avant la mise en place des réglementations. Malheureusement, il existe un fossé énorme entre le public et les chercheurs, car ceux-ci ne communiquent que très peu. Certains gros laboratoires industriels se mettent plus en avant en montrant les progrès accomplis dans la réduction du nombre d'animaux utilisés pour améliorer leur image de marque mais peu parlent de la réhabilitation car, dans leur grande majorité, les animaux utilisés sont des rongeurs qui de par leur grand nombre sont peu concernés par la réhabilitation.

En ce qui concerne l'aspect financier, une réhabilitation représente un coût pour le laboratoire, même si diminuer l'effectif d'une animalerie représente une économie d'argent, de temps et de travail, le bilan ne penche pas en faveur de la réhabilitation.

Les enjeux d'une généralisation de la réhabilitation sont aussi de se mettre, en matière de protection animale, au même niveau que des pays plus exigeants comme le Royaume- uni, le Canada ou la Suisse par exemple. En France, les propositions d'adoption ne sont pas largement diffusées car les unités de recherche ne souhaitent pas de publicité : diffuser des propositions d'adoption met plus en avant le fait que des expérimentations sur animaux sont pratiquées et moins sur la réhabilitation, aux yeux des profanes.

A-4 : Mise en place

A-4-1 : Quels animaux ?

Tous les animaux ne peuvent pas faire l'objet d'une réhabilitation.

Selon l'article 19 de la directive 2010/63/UE, les animaux utilisés ou destinés à être utilisés dans les procédures peuvent être placés si les conditions suivantes sont satisfaites :

- l'état de santé de l'animal le permet,

- il n'y a pas de danger pour la santé publique, la santé animale ou l'environnement,

- des mesures appropriées ont été prises pour assurer le bien-être animal.

Sont donc éligibles à la réhabilitation :

- les animaux témoins ou surnuméraires dans un protocole expérimental,

- les animaux ayant participé à un protocole expérimental de gravité légère à modérée, sans dommage irréversible (voir annexe II),

- les animaux issus de protocoles interrompus, également sans dommage irréversible,

- les animaux d'élevages spécialisés ne répondant pas aux critères des unités de recherche.

Au Royaume-Uni, on tient particulièrement compte du caractère d'adaptabilité de l'animal (52). Le rapport bénéfice/coût est évalué, le bénéfice résidant dans le bien-être futur de l'animal et le coût étant représenté par le stress lié au changement d'environnement et la capacité du sujet à s'y adapter. Et donc, si le sujet est jugé suffisamment sociabilisé ou sociabilisable, il fera l'objet d'une adoption.

Conformément aux critères exigés par l'article R 214-112 du code rural et de la pêche maritime (53), les animaux visés devront :

- ne pas être porteurs de maladie transmissible à l'homme ou à leurs congénères,

- ne pas présenter de risque pour l'environnement,

- être sociabilisés et avoir un comportement compatible avec une adoption.

Le degré de gravité d'une procédure expérimentale est déterminé en fonction de la douleur, de la souffrance, de l'angoisse ou du dommage durable qu'un animal donné risque de subir au cours de la procédure expérimentale. Les classes de gravité ainsi que les critères de classification sont définis par l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales :

Sans réveil : Les procédures expérimentales menées intégralement sous anesthésie générale, au terme desquelles l'animal ne reprend pas conscience, relèvent de la classe « sans réveil ».

Légère : Les procédures expérimentales en raison desquelles les animaux sont susceptibles d'éprouver une douleur, une souffrance ou une angoisse légère de courte durée ainsi que celles sans incidence significative sur le bien-être ou l'état général des animaux relèvent de la classe « légère ».

Modérée : Les procédures expérimentales en raison desquelles les animaux sont susceptibles d'éprouver une douleur, une souffrance ou une angoisse modérée de courte durée ou une douleur, une souffrance ou une angoisse légère de longue durée ainsi que celles susceptibles d'avoir une incidence modérée sur le bien-être ou l'état général des animaux relèvent de la classe « modérée ».

Sévère : Les procédures expérimentales en raison desquelles les animaux sont susceptibles d'éprouver une douleur, une souffrance ou une angoisse intense ou une douleur, une souffrance ou une angoisse modérée de longue durée ainsi que celles susceptibles d'avoir une incidence grave sur le bien-être ou l'état général des animaux relèvent de la classe « sévère ».

Dans tous les cas, l'intégrité physique et comportementale sera attestée par le vétérinaire en charge dans les établissements visés.

Le choix des animaux relève d'une concertation entre le responsable de l'unité de recherche, le vétérinaire et le responsable animalier. Plusieurs notions sont à prendre en considération comme la « remise en état » de l'animal qui ne devra pas nécessiter de traitement lourd. Les animaux auxquels on a administré une substance radioactive en sont exclus. Dans le cas particulier d'animaux génétiquement modifiés, il n'y a pas de remise en liberté possible. S'ils venaient à être placés, la stérilisation est préconisée mais dans la mesure où cela concerne des rongeurs, la réhabilitation est très peu envisageable. Les animaux dont le comportement est jugé dangereux, inaptes à s'améliorer après une sociabilisation menée par des spécialistes seront également écartés du processus.

L'âge de l'animal n'est pas un critère de choix.

Selon le GIRCOR, la mise à la retraite des animaux de laboratoire doit être envisagée quand :

- leur euthanasie n'est pas requise pour des raisons scientifiques, réglementaires ou liées à la préservation de leur état général et de leur bien-être,

- il n'est pas utile ou nécessaire de les conserver dans l'établissement pour des raisons scientifiques ou réglementaires,

- il n'est pas prévu de les réutiliser.

En ce qui concerne les espèces susceptibles d'être réhabilitées, on notera que les rongeurs et lagomorphes sont très peu réhabilités. En effet, ils restent les animaux les plus utilisés en expérimentation animale (62% pour la souris selon une enquête statistique de 2018) (54). Leur grand nombre, les lignées spécifiques ou génétiquement modifiées, et face à un nombre peu important de demandeurs, font qu'ils sont le plus souvent sacrifiés en fin de protocole.

Les singes sont souvent réutilisés mais s'ils doivent être placés, c'est en fait en retraite dans des structures spécialisées car leur placement chez des particuliers est proscrit compte tenu de leur mode de vie et de leur comportement.

Les grands animaux, en dehors des chevaux, sont également plus difficiles à réhabiliter car ils nécessitent des structures d'accueil spécifiques et le nombre de demandeurs est limité. Mais les choses sont en voie d'évolution comme nous le verrons plus tard. Les chevaux tiennent une place à part car ils sont davantage considérés comme animaux de compagnie maintenant et sont donc plus demandés par de potentiels adoptants.

Les principaux animaux concernés par la réhabilitation restent donc les chiens et les chats.

A-4-2 : <u>Quels laboratoires ?</u>

En 2010, l'Union Européenne a adopté une nouvelle directive (2010/63/UE) visant à mieux encadrer et protéger les animaux utilisés à des fins expérimentales et éducatives. Cette directive est transposée en droit français le 1er février 2013. Elle stipule que : « les états membres peuvent autoriser que les animaux utilisés soient placés ou relâchés ». Si les laboratoires sont fortement incités à envisager cette solution, ils n'y sont pas obligés : il n'est pas encore obligatoire, lors de l'établissement d'un protocole expérimental, de statuer sur le devenir des animaux utilisés, sauf si la mise à mort est indispensable comme lors de prélèvement de tissu, notamment cérébral.

Les laboratoires qui participent à la réhabilitation de leurs animaux le font donc sur le modèle du volontariat.

Les associations chargées de la réhabilitation travaillent en partenariat avec ces laboratoires.

Lorsque la mise à la retraite des animaux est envisagée dès la conception du projet d'étude, le comité d'éthique de l'établissement en est informé dans le cadre de la demande d'autorisation de projet. La mise à la retraite peut tout aussi bien être proposée au sein de l'établissement, indépendamment des projets d'étude. En tout état de cause, la décision finale de mise à la retraite des animaux sera prise, à la fin de la mise en œuvre des procédures le cas échéant, après avis du vétérinaire. Au sein de l'établissement, c'est à la structure chargée du bien-être des animaux qu'il revient de fournir des conseils sur les programmes de mise à la retraite des animaux, y compris sur la nécessité de sociabiliser les animaux concernés. Enfin, il ne faut pas oublier de vérifier que l'établissement qui envisage la mise à la retraite d'un animal en est bien le propriétaire (55).

A-4-3 : Quel coût ?

Réhabiliter un animal de laboratoire présente un coût certain pour le laboratoire et l'association qui le prend en charge. Le laboratoire doit assumer l'hébergement de l'animal jusqu'à sa prise en charge, les soins vétérinaires, certaines démarches administratives et bien souvent le transport jusqu'au refuge choisi. C'est un investissement en temps, en personnel et financier qui devra être pris en compte dès l'élaboration du protocole expérimental. Une étude américaine (56) a estimé ce budget à 0,4% du budget total de l'animalerie.

Les associations ou refuges prennent quant à eux en charge les frais d'hébergement dans leurs locaux (hébergement pouvant durer plusieurs semaines voire mois suivant l'animal, en fonction de son évolution), des soins vétérinaires et parfois le transport.

En France, plusieurs associations se sont spécialisées dans la réhabilitation des animaux de laboratoire. Nous allons les présenter ci-après.

A-5 : Le GRAAL

A-5-1 : Présentation

Le GRAAL (groupement de réflexion et d'action pour l'animal) est une association de défense des animaux qui a vu le jour en 1997, créée par Mme Marie-Françoise Lheureux. Son premier combat fût la lutte contre la corrida, mais aujourd'hui c'est le partenaire privilégié des laboratoires pour la réhabilitation des animaux issus de l'expérimentation. Sa démarche est fondée sur la recherche d'un dialogue ouvert et constructif entre les différents partenaires.

L'association GRAAL a conçu et mis en œuvre en 2005 une mission de service public: l'organisation au plan national de la retraite des animaux de laboratoire, toutes espèces confondues. Cette démarche légale, mais non contraignante reste toujours à la discrétion des laboratoires.

Association française pionnière, le GRAAL prend en charge plusieurs centaines d'animaux par an (chiens, chats, chevaux, primates, oiseaux, animaux de ferme, rongeurs, poissons).

Le GRAAL a placé son premier chien de laboratoire en 2005 dans le cadre de son projet « From Lab to Home » et, en 2014 l'association met en place un projet de réhabilitation pour les équidés qui permettra le placement des chevaux dès 2015.

L'association travaille aussi bien avec les laboratoires privés que publics. Elle compte plusieurs administrateurs, tous spécialistes dans un domaine particulier : éthologues,

scientifiques, vétérinaires, juristes, philosophes... Autant de professions et de points de vue qui font la richesse et la particularité de ce groupement.

Plusieurs pôles assurent le fonctionnement opérationnel de l'association :

- pôle réhabilitation animale,
- pôle équidés,
- pôle juridique,
- pôle communication.

Le rôle du GRAAL est d'assurer la coordination entre les unités de recherche et les lieux d'accueil, d'effectuer les démarches administratives auprès des autorités compétentes, de choisir les lieux d'accueil, d'assurer un suivi des animaux et de garantir la confidentialité au laboratoire.

Le GRAAL est une association constituée conformément à la loi de 1901 et reconnue d'utilité publique.

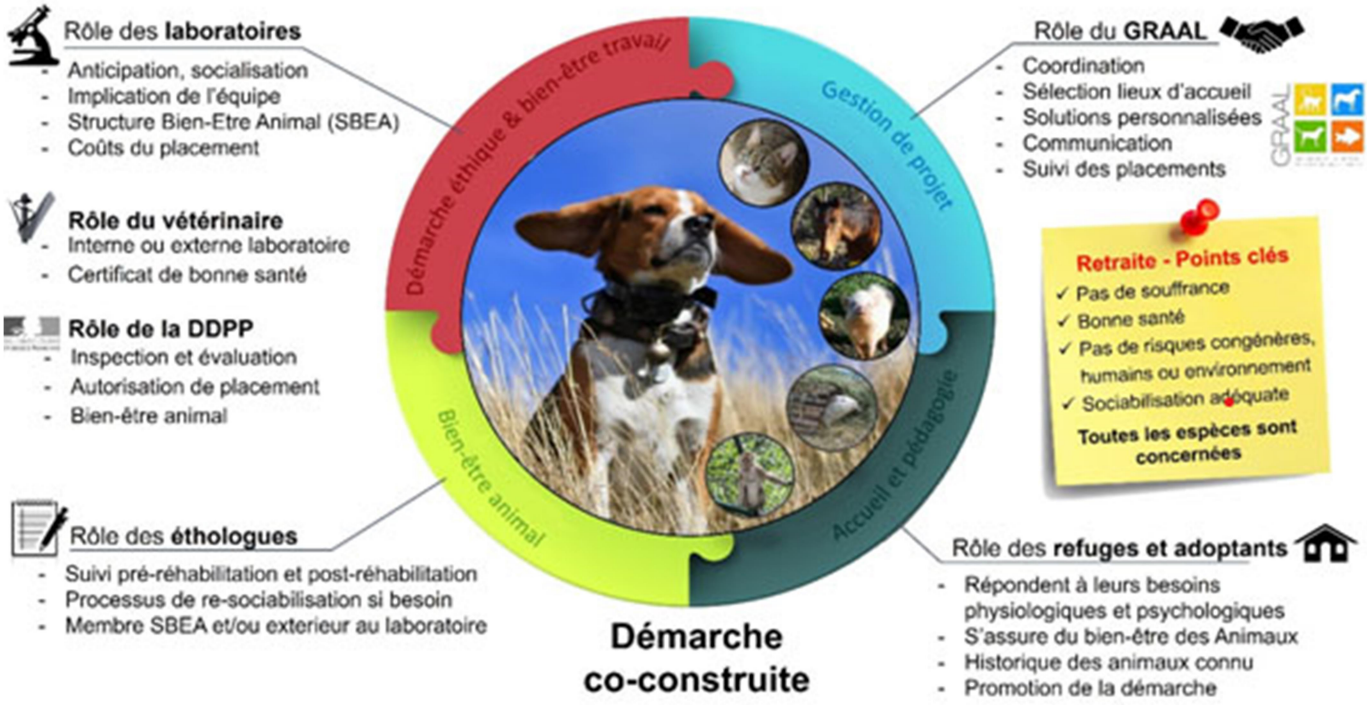


Fig.23: démarche du GRAAL (www.graal-defenseanimale.org)

A-5-2 : Processus de réhabilitation en partenariat avec le GRAAL

A-5-2-1 : contrat de cession

Dans un premier temps, l'unité de recherche sélectionne les animaux qu'elle envisage de faire entrer dans la procédure de réhabilitation. Cette décision se fait en concertation entre le vétérinaire, les chercheurs et le technicien animalier. Ce projet de retraite doit être validé par le responsable de l'établissement et la SBEA. Plus ce choix sera communiqué précocement au GRAAL et plus le placement des animaux sera facilité (choix d'un lieu d'accueil, transport...). C'est pourquoi le devenir des animaux doit désormais faire partie intégrante de la recherche (57).

Le laboratoire prend alors contact avec le GRAAL et lui indique le nombre d'animaux sélectionnés, leurs caractéristiques (espèce, sexe, âge, état sanitaire, évaluation comportementale) et la date de sortie prévue.

Chaque animal doit être muni d'un certificat sanitaire de bonne santé et d'une feuille de traçabilité où sont indiqués les caractéristiques de l'animal, son statut sanitaire (vaccination, stérilisation, maladie...), les protocoles expérimentaux suivis. On retrouve un exemple de ces documents en annexe IIIa et IIIb.

Il sera alors établi un contrat de cession entre la structure de recherche et l'association, dont un exemple se trouve en annexe IIIc. Par la suite, l'association établira un autre certificat de cession entre elle et la structure d'accueil. Cette procédure de double contrat garantit la confidentialité des informations liées au laboratoire (identité de l'entreprise, recherches effectuées, protocoles appliqués aux animaux...) et évite tout contact entre les structures d'accueil ou les adoptants et les laboratoires, se préservant ainsi des reproches qu'on pourrait leur faire, des revendications, des récriminations ou plaintes.

Conformément à l'article 30 de la Directive (53), le laboratoire doit mettre à jour le registre des animaux en notifiant leur retraite. Ce registre assure la traçabilité de la procédure pour le laboratoire.

Le sort réservé aux animaux à l'issue de l'expérimentation doit faire l'objet d'une proposition préalable incluse dans le protocole expérimental et doit être noté dans le registre des animaux (58).

Le GRAAL et les structures d'accueil mettent à jour leurs registres internes, grâce aux fiches de traçabilité et aux fiches de cession assurant cette fonction.

Dès que le/les lieu(x) d'accueil sont définis, le laboratoire effectue une demande d'autorisation de placement auprès de la DDPP inspectant le laboratoire (donc lieu de départ), et auprès de la DDPP dont la future structure d'accueil des animaux dépend (DDPP du lieu d'accueil).

Concernant les carnivores domestiques, ceux-ci doivent être stérilisés avant leur placement en structure d'accueil, aux frais du laboratoire, dans la mesure du possible. Mais l'impossibilité de la part du laboratoire d'assumer cette charge n'est pas un frein définitif.

A-5-2-2 : L'accueil des animaux

a- le transport

Le transport des animaux est assuré par le GRAAL dans les conditions sanitaires requises et adaptées aux différentes espèces.

Tout placement en provenance d'un établissement scientifique (quels que soient l'espèce et le lieu) doit faire l'objet d'une autorisation préalable auprès de la DDPP de départ et de destination (59). La demande doit être faite auprès de la DDPP inspectant le laboratoire qui se met en rapport avec la DDPP d'accueil des animaux. Cette demande doit être accompagnée d'un certificat vétérinaire conforme aux trois points exigés par l'article.

b- l'accueil provisoire

Le GRAAL n'est pas une structure d'accueil pour les animaux, son rôle est **la coordination**. Cette association travaille donc avec des structures préalablement sélectionnées rigoureusement pour assurer aux animaux les meilleures conditions d'hébergement suivant leur espèce. A l'heure actuelle, on recense plus de 130 refuges partenaires (SPA, fermes pédagogiques, refuges spécialisés NACs ou animaux de ferme, parcs animaliers, parcs zoologiques).

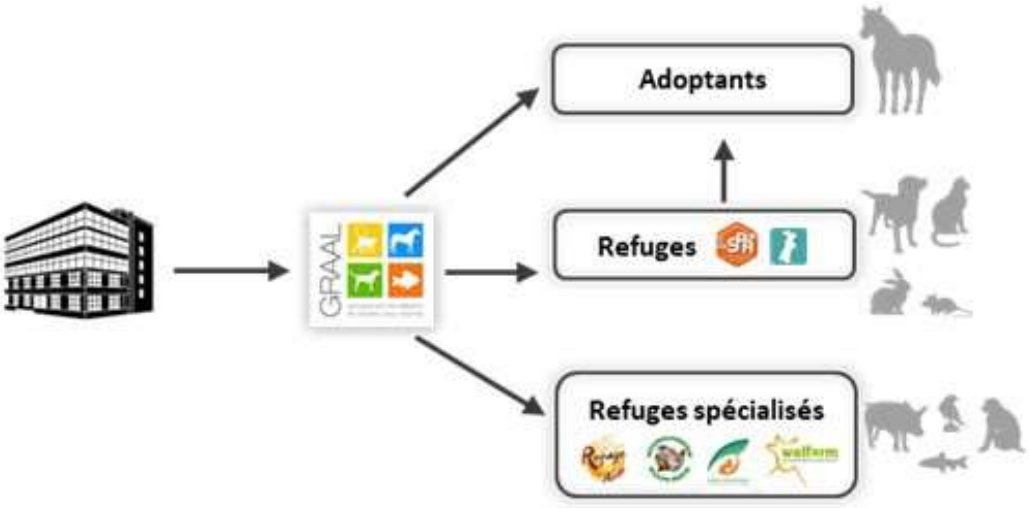


Fig.24 : placement des animaux (guide la retraite des animaux de laboratoire).

Pour les chiens et chats, le GRAAL travaille principalement avec des refuges membres de la CNSPA (confédération nationale des SPA de France), mais aussi avec des refuges indépendants. Il signe alors avec chacun d'entre eux un contrat spécifique. Cet accueil provisoire est également une période de transition pour l'animal, période qui sera mise à profit pour le sociabiliser à un nouvel environnement (bruits, personnes, autres animaux...). De plus en plus, les laboratoires sont incités à mettre en place cette sociabilisation dans leurs locaux, comme cela se pratique au Royaume-Uni. Mais cela demande un effort tant sur le plan du personnel que temporel ou financier qu'ils ne peuvent pas toujours se permettre. En effet, la sociabilisation d'un animal en privation sensorielle demande beaucoup de temps et un personnel compétent.

Concernant les chevaux, il existe peu de structures équestres capables de les accueillir provisoirement. La recherche d'adoptants sera préférentiellement faite en amont afin de les transférer directement dans leur famille d'accueil définitive.

Les petits animaux (rats, souris, cobayes, lapins, furets...) pourront être accueillis dans les refuges chiens/chats ou pris en charge par des associations spécialisées comme White Rabbit ou la ferme de Doudou par exemple.

Les animaux de ferme (bovins, ovins, caprins et porcins) font encore assez peu l'objet de réhabilitation mais il existe cependant des refuges spécialisés tels Welfarm, la ferme de la Hardonnerie, les fermes pédagogiques...

En ce qui concerne les primates, plusieurs structures peuvent les accueillir : certains zoos (refuge zoo La Tannière dans la Vienne), le refuge de l'arche en Mayenne, Tonga terre d'accueil dans la Loire ou Natuurhulp Centrum en Belgique.

c- le choix des adoptants

Dès leur arrivée dans les structures d'accueil, le GRAAL cède la propriété des animaux à ces mêmes structures par l'intermédiaire d'un contrat de cession. Ce sont donc ces structures qui sont en charge de l'adoption des animaux. Si les familles ont pris contact directement avec le GRAAL, elles seront orientées vers la structure la plus à même de répondre à leurs attentes. En aucun cas les adoptants ne seront en contact direct avec le laboratoire et ils n'auront aucun renseignement le concernant. Majoritairement, les adoptants sont des personnes ayant contact avec des intervenants dans le processus, la réhabilitation n'ayant pas une grande couverture médiatique, même si on en parle un peu dans la presse.

Les familles candidates doivent disposer de suffisamment de temps à consacrer à leur animal car son comportement ne sera pas celui d'un animal élevé en famille depuis son plus jeune âge, même s'il a suivi une période de sociabilisation et d'adaptation avant son placement. Elles doivent être suffisamment motivées et conscientes des problèmes éventuels qu'elles pourraient rencontrer pour que cette réhabilitation soit un succès.

L'adoption par paire, ou la présence d'un autre animal au sein du foyer sera privilégiée car les études ont montré que c'était un atout supplémentaire pour l'adaptation.

Les structures d'accueil en charge de l'animal doivent prendre le temps de l'étudier afin de cibler au mieux ses besoins et ses lacunes de manière à lui trouver ainsi la famille qui

lui correspond. Il peut être nécessaire de faire appel à des professionnels du comportement pour pallier aux problèmes les plus graves.

Le GRAAL a rédigé une charte à destination des adoptants afin de les préparer au mieux à cette adoption (55). Dans tous les cas, la préoccupation première reste le bien-être de l'animal.

d- le suivi des adoptions

Tous les animaux retraités placés font l'objet d'un suivi pour de s'assurer de leur bien-être dans leur nouvel environnement sur une période de 2 à 3 mois post-adoption. Les animaux de compagnie correctement sociabilisés en amont sont en général adoptés dans un délai de 15 jours à 1 mois.

Des retours réguliers sont effectués auprès des laboratoires partenaires afin d'informer les équipes de recherche et le personnel animalier du devenir des animaux.

Les principaux problèmes rencontrés par les adoptants sont :

- la néophobie et les peurs primaires,
- l'asociabilité totale,
- le manque d'obéissance,
- la malpropreté,
- l'agressivité vis-à-vis de la famille ou des autres animaux,
- la destruction et les vocalises (anxiété de séparation) (60).

Si la plupart de ces problèmes sont résolus en un temps relativement court (quelques jours à quelques semaines), d'autres perdurent beaucoup plus longtemps tels l'asociabilité ou l'anxiété de séparation par exemple.

Les problèmes ne sont pas les mêmes suivant les espèces adoptées.

Les figures ci-après récapitulent les principaux problèmes rencontrés suivant les espèces adoptées :

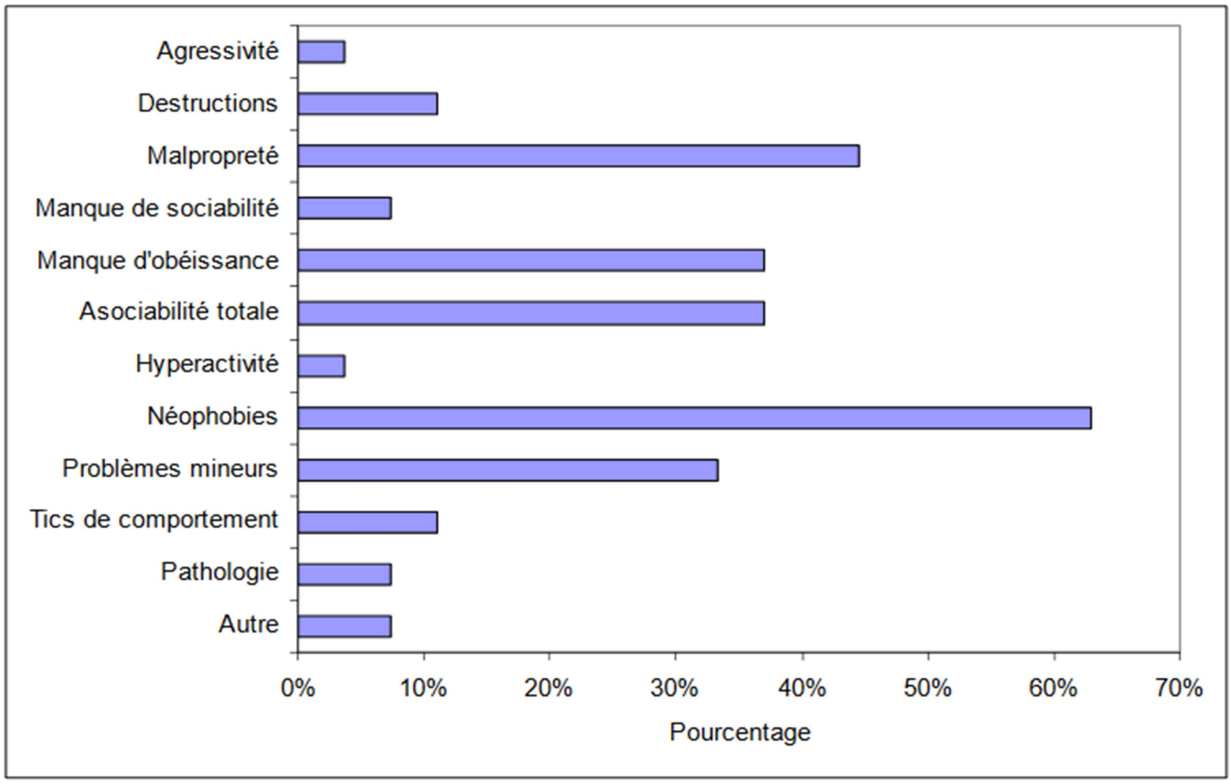


Fig.25 : problèmes rencontrés par les adoptants de chien (60)

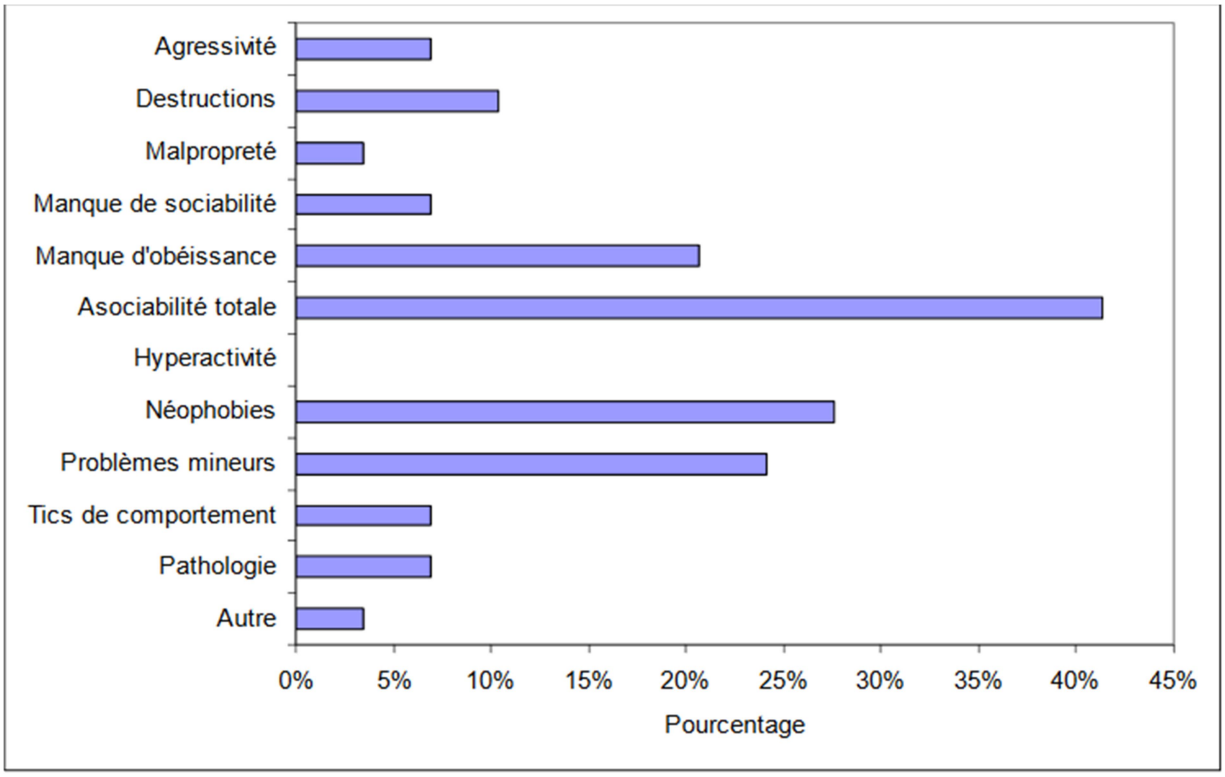


Fig.26 : problèmes rencontrés par les adoptants de chat (60)

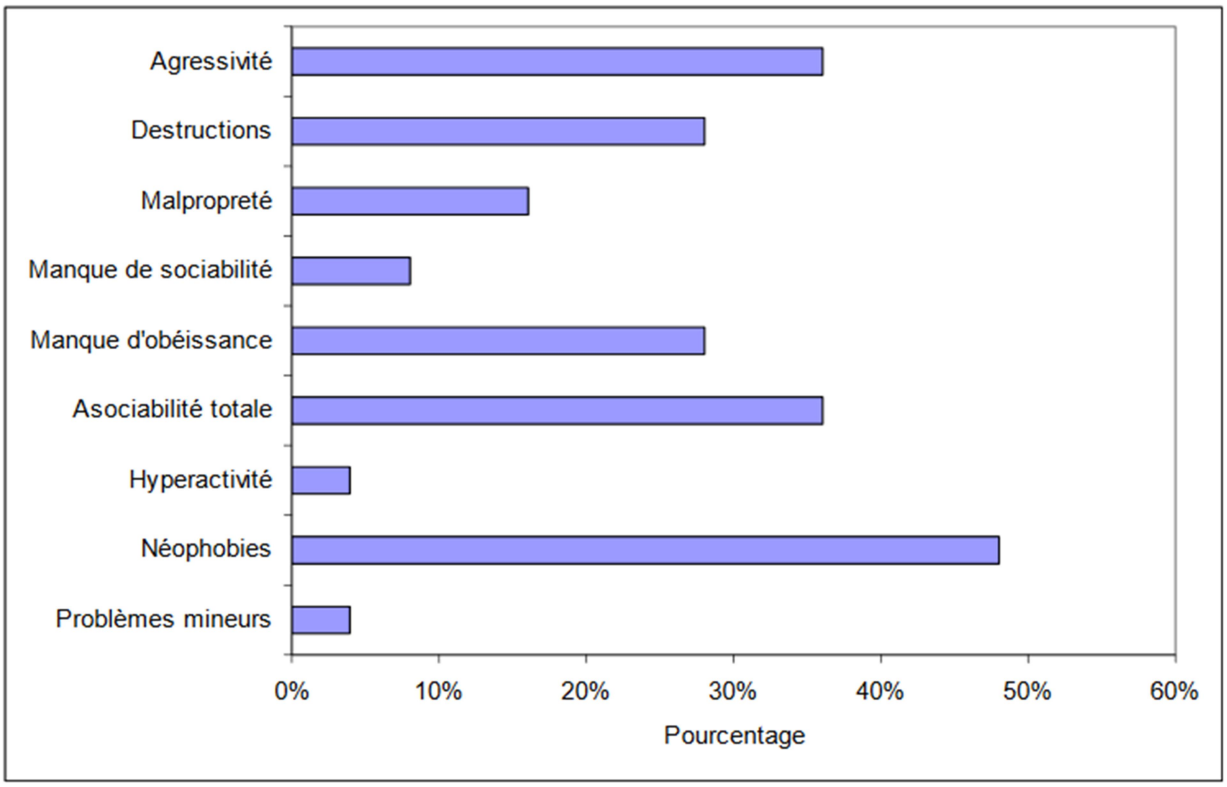


Fig.27 : problèmes rencontrés par les adoptants de rat (60)

En conclusion, on remarque que la néophobie et l'asociabilité sont récurrentes dans toutes les espèces étudiées ci-dessus. La malpropreté est plus spécifique aux chiens ce qui s'explique par le mode de vie qu'on leur impose par la suite (vie de famille par rapport à vie en chenil).

A-5-3 : <u>bilan des réhabilitations</u>

En 2019, le GRAAL comptait plus de 3000 animaux, toutes espèces confondues, ayant pu bénéficier d'une réhabilitation. Le GRAAL a ainsi réhabilité à ce jour environ 1.000 beagles, 50 primates, 100 chevaux (depuis 2015, le GRAAL réhabilite entre 50 et 80 chevaux de laboratoire par an), plusieurs centaines de poissons, des oiseaux, des rongeurs et des petits animaux de ferme. Le GRAAL a travaillé auprès d'une soixantaine de laboratoires, écoles vétérinaires, universités et lycées agricoles de France.

Le GRAAL est à ce jour, en France, la seule structure à proposer une solution de placement **toutes espèces confondues**, officielle et totalement encadrée, aux laboratoires et aux éleveurs d'animaux de laboratoire.

A-5-4 : Cas particulier des primates

La réhabilitation des primates est particulière, car elle nécessite des structures d'accueil spécialisées. Il n'est en effet pas possible de les placer chez des particuliers et peu de zoos peuvent les accueillir dans leurs effectifs.

Ces animaux ont souvent été maintenus seuls, ou en binôme alors qu'ils appartiennent à des espèces sociales. En milieu naturel, les macaques vivent en général en groupe d'une dizaine d'individus, majoritairement des femelles, alors qu'en laboratoire on utilise beaucoup plus de mâles. Il faudra donc les resocialiser en amont afin de les habituer à un nouvel environnement (accès à un extérieur par exemple), et recréer des groupes sociaux.

L'espérance de vie de ces animaux étant longue (de l'ordre de 25 à 30 ans), la mise à la retraite intervenant vers leur 10ème année et les places étant peu nombreuses, les structures sont rapidement saturées.

Actuellement le GRAAL travaille sur un projet de volière en partenariat avec le zoo refuge de la Tanière. Ce sanctuaire a pour vocation d'accueillir des animaux issus de saisies de cirques ou réformés de laboratoire et permettra d'accueillir une vingtaine de macaques en permanence.

A ce jour, le GRAAL a pu offrir une retraite à plus de 70 primates.

A-6 : Autres associations

Comme nous l'avons vu, le GRAAL n'œuvre pas seul, d'autres associations travaillent en partenariat avec lui, soit pour l'accueil des animaux soit pour leur expertise dans des domaines particuliers.

A-6-1 : White Rabbit

L'association White Rabbit a été fondée officiellement en 2014 et se consacre à la réhabilitation et à l'adoption des lapins de laboratoire et autres petits rongeurs dans un cadre légal.

Son action s'étend sur toute la France et concerne toutes les races de lapin.

Elle travaille soit en lien direct avec les laboratoires ou élevages partenaires, soit en collaboration avec le GRAAL.

A ce jour cette association a permis l'adoption de 1759 animaux dont 113 lapins.

A-6-2 : <u>Ethosph'R</u>

Ethosh'R est une association créée en 2016, regroupant des éthologistes et des personnes impliquées dans l'éthique animale, dont le rôle est de promouvoir la resocialisation dans le processus de réhabilitation des animaux de laboratoire. Elle intervient en amont de la mise à la retraite et dans le suivi scientifique des réhabilitations des animaux, soutenue par la SFCA (société française pour l'étude du comportement animal). Un suivi rigoureux de la réhabilitation permet de prouver sa faisabilité et par là même d'inciter les laboratoires à promouvoir cette démarche éthique et respectueuse des animaux.

Au niveau des laboratoires, ses experts contribuent à améliorer les conditions de vie et accompagnent les scientifiques dans le changement de leurs pratiques, le but ultime étant toujours l'amélioration du bien-être.

Au niveau des structures d'accueil, ils contribuent à leur conception (zoos, sanctuaires) car : « *pour que la réhabilitation soit une véritable alternative, les conditions de vie des animaux doivent être égales ou meilleures que celles en laboratoire »* (Odile PETIT, présidente d'Ethosh'R) (55).

Ils agissent directement sur le terrain en apportant leurs conseils sur la méthodologie à adopter pour la resocialisation ou pour le regroupement d'animaux pour les espèces sociales (primates, chevaux).

Ainsi, ils ont contribué à la resocialisation de macaques par la création de groupes ou couples de macaques (octobre et novembre 2019 au zoo refuge de la Tanière).

B- La réutilisation

B-1 : Cadre légal

La réutilisation des animaux dans des procédures expérimentales est réglementée par la directive du parlement européen et du conseil relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, article 16 :

1- les états membres veillent à ce qu'un animal déjà utilisé dans une procédure ne puisse être réutilisé dans une nouvelle procédure, lorsqu'un animal différent auquel aucune procédure n'a été appliquée précédemment pourrait aussi être utilisé, que si toutes les conditions suivantes sont satisfaites:

a) la procédure précédente était classée comme étant d'une gravité « nulle à légère » ;

b) il est démontré que son état de santé et son bien-être général a été pleinement rétabli ;

c) la nouvelle procédure est classée comme étant d'une gravité « nulle à légère » ou « sans réanimation ».

2- Par dérogation au paragraphe 1, l'autorité compétente, sur la base d'arguments scientifiques, peut autoriser la réutilisation d'un animal pour autant que l'animal ne soit pas utilisé plus d'une fois après avoir été soumis à une procédure entraînant des douleurs intenses, de l'angoisse ou des souffrances équivalentes et que la nouvelle procédure soit classée comme étant d'une gravité « nulle à légère » ou « sans réanimation ».

La réutilisation d'un animal ne peut se faire qu'avec l'avis du vétérinaire en charge de la structure de recherche et lorsque l'animal a pleinement retrouvé son état de santé et de bien-être.

La réutilisation des animaux permet de diminuer le nombre d'animaux engagés dans une procédure.

B-2 : Les animaux réutilisés

B-2-1 : Selon l'espèce

Toutes les espèces ne sont pas réutilisées de la même manière. Il existe plusieurs critères de choix :

- la valeur marchande de l'animal,
- l'espérance de vie de l'espèce concernée,
- les modifications génétiques éventuelles.

Chaque animal n'a pas la même valeur marchande. Le prix moyen d'un singe est de 5000 à 8000 euros alors que les souris ne coûtent que quelques euros même quand il s'agit de lignées particulières. Le prix d'un singe est d'ailleurs en croissance exponentielle car la demande actuelle, au niveau mondial, est très forte, en raison des recherches concernant le vaccin de la Covid 19.

Ce prix est lié au fait que les animaux ne doivent provenir que d'élevages spécialisés en France ou à l'étranger et dans ce cas il faut tenir compte du coût de l'importation. Le prélèvement d'individus dans la nature est strictement interdit (57).

Les singes ou les autres grands animaux ont un taux de fertilité nettement inférieur à celui des rongeurs, tant sur la durée de gestation et donc le nombre de portées par an que sur le nombre d'individus par portée.

De plus les petits rongeurs, les lapins et les volailles seront disponibles pour la vente à l'âge de quelques semaines (en général à partir de 3 semaines) alors qu'il faudra attendre beaucoup plus longtemps pour des espèces comme les primates ou les animaux de rente de grande taille.

L'espérance de vie des animaux est également un facteur essentiel pour la réutilisation. En effet, des espèces à faible longévité comme les souris, rats ou poissons seront moins concernés par la réutilisation alors qu'elles font parties des espèces les plus utilisées.

Des études statistiques sur la réutilisation des animaux de laboratoire sont faites tous les ans (61).

Voici deux tableaux de résultats à quelques années d'écart :

Tableau 2 : réutilisation des animaux en 2014 (61).

Espèces	Non réintégrés	Réintégrés	Total	Pourcentage (%)
Céphalopodes (Cephalopoda)		1	1	100
Reptiles (Reptilia)	56	256	312	82
Chèvre (Capra aegagrus hircus)	125	319	444	72
Furet (Mustela putorius furo)	30	63	93	68
Cheval, âne et croisements (Equidae)	127	232	359	65
Autres rongeurs (Rodentia)	664	914	1578	58
Chat (Felis catus)	292	337	629	54
Bovin (Bos primigenius)	933	965	1898	51
Singe écureuil (Saimiri sciureus)	2	2	4	50
Macaque cynomolgus (Macaca fascicularis)	547	298	845	35
Macaque rhesus (Macaca mulatta)	25	11	36	31
Chien (Canis familiaris)	2065	787	2852	28
Xénope (Xenopus laevis and Xenopus tropicalis)	194	53	247	21
Mouton (Ovis aries)	1619	315	1934	16
Porc (Sus scrofa domesticus)	7760	594	8354	7
Autres carnivores	16	1	17	6
Gerbille de Mongolie (Meriones unguiculatus)	1112	58	1170	5
Poisson zèbre (Danio rerio)	11327	338	11665	3
Rat (Rattus norvegicus)	128386	3336	131722	3
Autres mammifères	776	20	796	3
Autres oiseaux (Aves)	43457	791	44248	2
Hamster doré (Mesocricetus auratus)	9467	56	9523	1
Souris (Mus musculus)	850501	3054	853555	--
Lapin (Oryctolagus cuniculus)	88027	307	88334	--
Poulet domestique (Gallus gallus domesticus)	48453	75	48528	--
Cochon d'Inde (Cavia porcellus)	36109	43	36152	--
Prosimien (Prosimia)	55		55	--
Vervets Chlorocebus spp.	14		14	--
Babouins (Papio)	149		149	--
Grenouille (Rana temporaria and Rana pipiens)	80		80	--
Autres poissons	524024		524024	--
Total	1756392	13226	1769618	

Les animaux les plus fréquemment réutilisés dans des procédures expérimentales sont donc selon ce tableau, les reptiles (82%), les chèvres (72%), les furets (68%) et les équidés (chevaux, ânes et animaux issus du croisement de ces équidés (mulets, bardots)), 65% (61).

Tableau 3 : réutilisation des animaux en 2018 (61).

Espèces	Réutilisés	Total	Pourcentage de réutilisation pour chaque espèce
[A30] Reptiles	2 102	2 120	99,2
[A15] Chèvres (Capra aegagrus hircus)	552	710	77,7
[A13] Chevaux, ânes et croisements (Equidés)	360	482	74,7
[A19] Ouistitis, Marmosets et tamarins	147	206	71,4
[A9] Chats (Felis catus)	748	1 185	63,1
[A23] Babouins (Papio spp.)	19	36	52,8
[A17] Bovins (Bos primigenius)	1 083	2 256	48,0
[A21] Macaques rhesus (Macaca mulatta)	28	62	45,2
[A10] Chiens (Canis familiaris)	1 645	4 219	39,0
[A16] Moutons (Ovis aries)	1 167	4 304	27,1
[A20] Macaques cynomolgus (Macaca fascicularis)	724	3 009	24,1
[A7] Autres rongeurs	602	2 913	20,7
[A27] Autres mammifères	15	104	14,4
[A36] Céphalopodes	16	219	7,3
[A32] Xénopes (Xenopus laevis et Xenopus tropicalis)	445	9 289	4,8
[A35] Autres poissons	9 990	231 760	4,3
[A2] Rats (Rattus norvegicus)	5 217	159 786	3,3
[A28] Poules, coqs et poulets (Gallus gallus domesticus)	819	46 029	1,8
[A14] Porcs (Sus scrofa domesticus)	255	14 969	1,7
[A8] Lapins (Oryctolagus cuniculus)	1 972	131 587	1,5
[A1] Souris (Mus musculus)	14 315	1 192 548	1,2
[A29] Autres oiseaux	297	29 095	1,0
[A34] Poissons zébres (Danio rerio)	204	25 127	0,8
[A3] Cochons d'Inde (Cavia porcellus)	49	41 727	0,1
[A4] Hamsters dorés (Mesocricetus auratus)		5 193	
[A6] Gerbilles de Mongolie (Meriones unguiculatus)		596	
[A33] Autres amphibiens		458	
[A31] Grenouilles (Rana temporaria et Rana pipiens)		256	
[A18] Prosimiens		159	
[A12] Autres carnivores		29	
[A11] Furets (Mustela putorius furo)		28	
[A25-1] Autres espèces de singes de l'ancien monde		22	
[A5] Hamsters de Chine (Cricetulus griseus)		20	
[A22] Singes vervet (ex. Chlorocebus sabaeus)		16	
Total général	**42 771**	**1 910 519**	

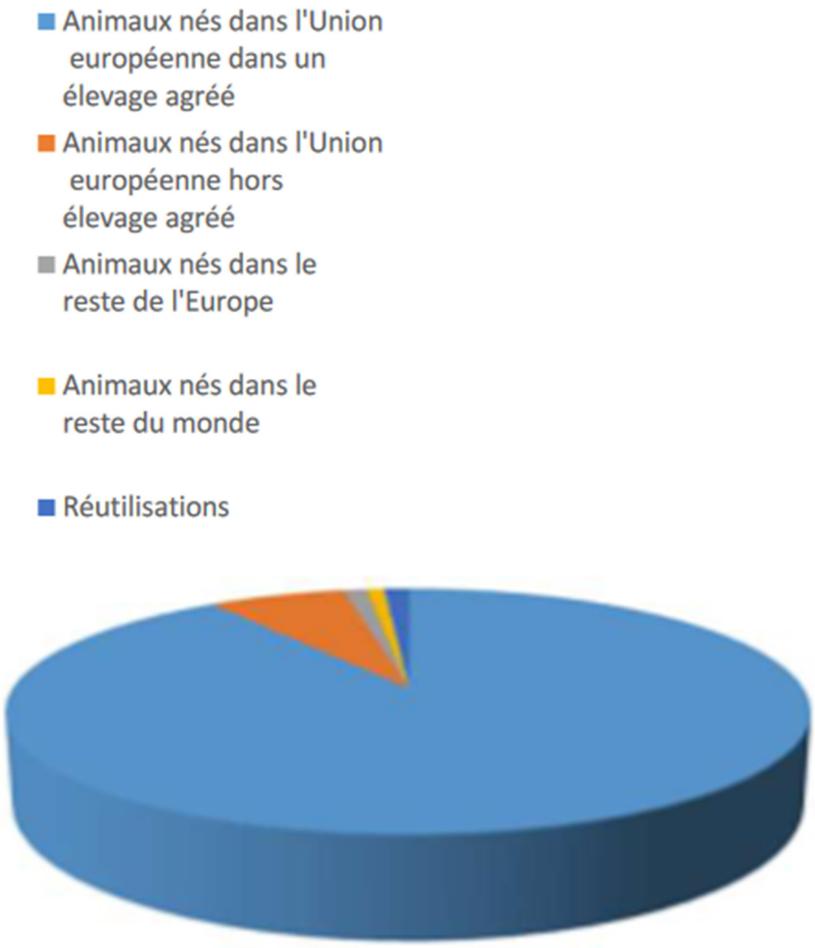
On peut donc constater que la catégorie la plus fréquemment réutilisée en 2018 est celle des reptiles (principalement le lézard vivipare, 99 %). Viennent ensuite les chèvres (78 %), chevaux et autres équidés (75 %) et chats (63%). Les primates sont fréquemment réutilisés : marmousets (71%), babouins (53%), singes rhésus (45%), et macaques (24%).

En quatre ans, la réutilisation a surtout bénéficié aux singes : macaques (35% en 2014 contre 52.8% en 2018), babouins (0% en 2014 contre 45% en 2018), les chiens dans

une moindre mesure (28% en 2014 contre 39% en 2018). Les statistiques concernant les rongeurs ont peu évolué: rats (3% en 2014 contre 3,3 en 2018), souris (0% en 2014 contre 1,2 en 2018).

En 2018, 5% des animaux utilisés en expérimentation animale étaient issus de la réutilisation. En 2014, le pourcentage d'animaux issus de la réutilisation était si minime qu'il ne figure pas dans les statistiques comme le montre la figure 28 ci-dessous.

En 2018 :



En 2014 :

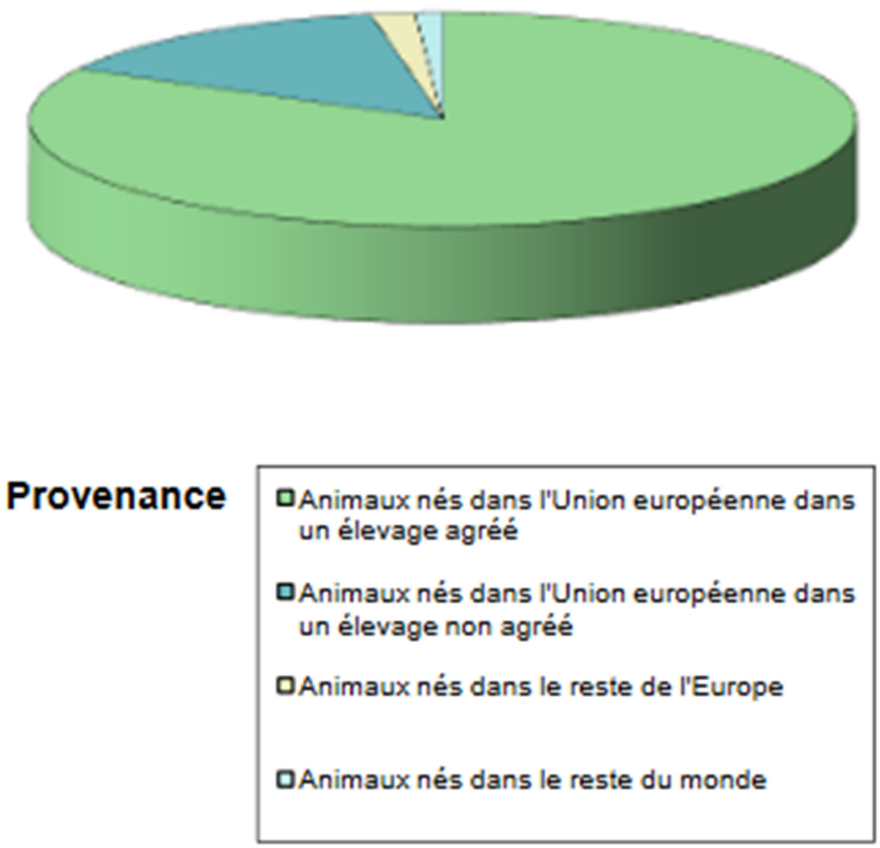


Fig.28 : provenance des animaux pour l'expérimentation (61)

On constate une augmentation de la réutilisation des animaux sur cette période de 4 ans. On peut probablement en attribuer le mérite à la mise en place et au respect de la directive européenne (57) de la part des établissements de recherche et d'expérimentation et des consignes proposées par l'INRAE.

B-2-2 : <u>selon le protocole</u>

Les animaux réutilisables ne doivent avoir subi qu'une procédure légère à modérée.

Avant de réutiliser un animal, il faut tenir compte de la gravité réelle des procédures cumulées. Tout animal ayant subi auparavant une procédure jugée sévère ne pourra être réutilisé.

Comme nous l'avons déjà vu, les procédures expérimentales se classent en procédure :

- sans réveil,
- sévère,
- modérée (douleur, souffrance ou angoisse modérée de courte durée, ou douleur, souffrance ou angoisse légère de longue durée),
- légère (souffrance, douleur ou angoisse légère de de courte durée, ou toute manipulation sans incidence significative sur le bien-être ou l'état général),
- gravité nulle.

La classe de gravité des procédures doit être déterminée en amont, lors de l'élaboration du projet expérimental, de manière à pouvoir mettre en place des mesures de raffinement telles que l'anesthésie ou l'analgésie.

La détermination des classes de gravité doit impérativement tenir compte de l'espèce concernée, de la souche mais également du stade de développement.

En effet des espèces type proie expriment moins la douleur : c'est ce qu'on appelle la résilience ou le stoïcisme. Connaître et comprendre la biologie de ces espèces permet de mieux interpréter les signes observés. Certains animaux peuvent ressentir une douleur intense sans changement notable de comportement (lapins, moutons...) (62).

D'autre part, certaines espèces se laissent plus facilement manipuler (chiens, chats, chevaux …) que d'autres, surtout si un travail de sociabilisation a été mené au préalable. De plus, il existe un potentiel d'acclimatation qui peut réduire la gravité d'une intervention, par exemple l'habituation de l'animal aux manipulations (prise de sang sur les chiens ou primates). Mais parfois, la répétition augmente le stress donc la gravité car l'animal "anticipe" (réflexe acquis).

Il n'y a pas de lien direct entre la fréquence et la gravité. La classification se fait en fonction de l'intensité de chaque intervention et de sa durée. La gravité ne se mesure pas seulement sur le plan physique mais aussi sur le plan émotionnel, par rapport au stress ou à la baisse du bien-être de l'animal.

Il est donc essentiel que l'évaluation se fasse de manière individuelle, tous les jours voire plus si on le juge nécessaire, par du personnel qualifié (techniciens animaliers, vétérinaires), selon des critères bien codifiés pour éviter les variations liées à l'interprétation personnelle des intervenants (notation numérique, scoring pré établi). Il existe pour çela des feuilles de score, sur lesquelles on note les critères visuels (aspect extérieur, comportement, fonctions corporelles telle prise d'aliment) et les critères non visuels (température corporelle, poids, paramètres biochimiques ou télémétriques, rythme cardiaque, respiratoire...). Ces grilles de score sont spécifiques à un animal ou à un groupe d'animaux qui doit être clairement identifié : identification électronique pour les espèces concernées ou identification du lot pour les rongeurs et les poissons. Un exemple de fiche de score figure en annexe V.

Lorsque plusieurs scores sont notés, on prend en compte le score de gravité le plus élevé dans l'évaluation finale.

La gravité réelle est évaluée en fin de procédure par le vétérinaire, le responsable autorisé et le comité d'éthique. À ce stade, une décision doit être prise concernant la gravité

réelle globale subie par l'animal, sur la base des évaluations journalières et en tenant compte des procédures effectuées.

L'analyse de ces grilles de score avec la détermination du stade de gravité des procédures fournit des informations statistiques et permet ainsi l'évaluation du projet a posteriori. Une réflexion pourra alors être menée sur les autres possibilités de mise en œuvre des 3R.

Cela permettra de plus, de générer des données de bases pour des projets d'études similaires à venir.

C- La responsabilisation

C-1 : Qu'est-ce que la responsabilisation

La définition de la responsabilisation est « *le fait de rendre responsable en faisant participer aux décisions», ou* « *rendre quelqu'un ou un groupe conscient de ses responsabilités».*

Être responsable implique un investissement personnel dans un domaine particulier de compétence. C'est pourquoi la responsabilisation en matière d'expérimentation animale doit passer par une formation spécifique et adaptée de tous les intervenants. C'est d'ailleurs clairement exprimé dans la directive 2010/63/UE, article 28 : « *Le bien-être des animaux utilisés dans des procédures dépend grandement de la qualité et des compétences professionnelles du personnel qui supervise les procédures, qui mène les procédures ou qui supervise les personnes chargées des soins quotidiens aux animaux. Les États membres devraient faire en sorte, par un système d'agrément ou d'autres moyens, que le personnel dispose d'un niveau d'études, de formation et de compétences adéquat. En outre, il est important que le personnel soit supervisé jusqu'à ce qu'il ait acquis et démontré qu'il possède les compétences requises. Des lignes directrices non contraignantes au niveau de l'Union concernant les exigences en matière de formation favoriseraient à long terme la libre circulation du personnel »* (63).

Certaines définitions introduisent également la notion d'obligation de résultat et de justification. En effet, la responsabilisation c'est justifier le recours à l'expérimentation animale : *l'expérimentation sur l'animal ne doit pas pouvoir être remplacée utilement par d'autres méthodes expérimentales (méthodes substitutives) et doit revêtir un caractère de nécessité. Le résultat de cette expérimentation doit montrer un apport bénéfique pour la santé de l'homme ou l'animal ou dans la protection de l'environnement.*

La notion de résultat est un concept absolument inenvisageable en recherche fondamentale, le but étant de comprendre des mécanismes physiologiques pour éventuellement trouver des traitements contre certaines maladies.

En recherche pharmaceutique, toutes les molécules testées ne donneront pas forcément des médicaments.

En revanche la notion de justification a pleinement sa place dans l'éthique en expérimentation animale. Tout processus de recherche doit faire l'objet d'une étude minutieuse par les autorités compétentes et l'expérimentation sur des animaux est autorisée si et seulement si elle est nécessaire et irremplaçable (par d'autres méthodes dites alternatives qui n'utilisent pas d'animaux). C'est ce qu'on appelle la licéité d'une expérimentation. De plus, chaque projet de recherche susceptible de causer à l'animal une douleur, une souffrance, une angoisse ou des dommages durables équivalents à ceux causés par l'introduction d'une aiguille effectuée conformément aux bonnes pratiques vétérinaires, doit faire l'objet d'une évaluation éthique et d'une autorisation délivrée par le ministre de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation après avis d'un comité d'éthique agréé .

Les comités d'éthique en expérimentation animale interviennent donc en amont, avant la délivrance de l'autorisation mais tout au long de la procédure on verra que d'autres instances veillent au respect des règles et à l'application des « bonnes méthodes », ce sont les structures de bien-être animal.

C-2 : Formation du personnel

Les formations réglementaires sont approuvées par le ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt après avis de la CNEA (Commission Nationale de l'Expérimentation Animale).

Le personnel travaillant avec les animaux doit être qualifié en suivant une formation initiale spécifique et adaptée à son implication dans les procédures expérimentales (conception / réalisation / soins), associée à une formation continue afin de maintenir et étendre ses compétences (arrêté du 1er février 2013, relatif à l'acquisition et à la valorisation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins expérimentales) (64).

C-2-1 : Formation initiale et formation spécifique

La réglementation définit quatre fonctions pouvant être exercées dans le cadre de manipulation d'animaux :

- la conception et réalisation des procédures,
- l'application des procédures expérimentales,
- les soins aux animaux,
- la mise à mort des animaux.

Tableau 4: les différents niveaux de formation et leurs correspondances (65)

Pour mémoire, dénomination directive européenne 1986	Fonction (directive européenne 2010)	Fonction (Décret français)	Termes utilisés dans le guide	Dénomination FELASA
Niveau I	Fonction b : conception de procédures expérimentales	Fonction 1* : conception ou réalisation des procédures expérimentales	Concepteur	C
Niveau II	Fonction a : application de procédures expérimentales	Fonction 2 **: application des procédures expérimentales	Applicateur	B
Niveau III	Fonction c : soins aux animaux	Fonction 3 : soins aux animaux	Soigneur	A
Non applicable	Fonction d : mise à mort des animaux	Fonction 4*** : mise à mort des animaux	Personne exerçant la mise à mort des animaux	Non applicable

*cette fonction permet également d'assurer les fonctions 2, 3 et 4
**cette fonction permet également d'assurer les fonctions 3 et 4
***les autorités françaises n'ont pas souhaité identifier de personnel spécialisé dans cette fonctior la formation pratique pour cet item est incluse dans les formations 1 et 2.

La formation initiale n'est exigée que pour les personnels qui conçoivent ou réalisent les procédures expérimentales (les concepteurs et applicateurs c'est-à-dire le personnel qui applique les procédures expérimentales).

Elle inclut un diplôme sanctionnant un minimum de 5 années d'études supérieures dans une discipline scientifique ayant trait au travail effectué pour les concepteurs de projet, ou un diplôme Bac+2, avec un minimum de 5 années d'expérience professionnelle validées par un ou des concepteurs pour les applicateurs (65).

La formation spécifique concerne tous les personnels des établissements: concepteurs, applicateurs et soigneurs.

Cette formation spécifique doit être suivie dans l'année qui suit la prise de fonction. Elle permet l'exercice de cette même fonction.

Le volume horaire de cette formation est de :

- 57 heures pour un concepteur de projet,
- 45 heures pour l'applicateur de procédure (64).

Le but de cette formation est la sensibilisation au bien-être animal et aux bonnes pratiques expérimentales.

La mise à mort n'est pas considérée comme une fonction, elle doit être effectuée par une personne formée de manière adaptée (64). Elle est intégrée dans les fonctions de conception ou d'application des procédures. De ce fait, les personnes qui ont été formées pour assurer les soins aux animaux ne peuvent pas réaliser d'euthanasie.

L'animalier / l'animalière de laboratoire effectue toutes les tâches qui ont pour objectif la gestion (enregistrement des données techniques), la sélection, l'élevage et l'entretien des animaux que possède un laboratoire de recherche médicale ou pharmaceutique. La formation requise est un BP technicien animalier en unité d'expérimentation ou un Bac pro TEA - technicien en expérimentation animale.

Le tableau ci-après résume les compétences liées aux différentes fonctions.

Tableau 5 : les compétences acquises et les différentes fonctions (66)

	Personnels concevant des procédures expérimentales et des projets = CONCEPTEUR	Personnels appliquant des procédures expérimentales et des projets = PRATICIEN	Personnels assurant les soins aux animaux = SOIGNEUR	Personnels assurant la mise à mort des animaux
Formation initiale	Bac+5 ou Bac+2 et 5 ans d'expérience			
Formation spécifique	B (ex-niveau I)	A (ex-niveau II)	C (ex-niveau III)	D
Formation continue	3 jours sur 6 ans	3 jours sur 6 ans	3 jours sur 6 ans	3 jours sur 6 ans
		animalier		

Cette formation se scinde en 2 parties : une partie générale et un cursus spécifique.

La partie générale, tronc commun pour toutes les espèces, reprend la réglementation et les principes éthiques.

La partie spécifique comprend un module particulier pour un groupe d'espèces :

- les rongeurs,
- les mammifères de rente,
- les carnivores, les oiseaux,
- les animaux à sang froid,
- les primates et
- la faune sauvage.

Le personnel doit suivre le module spécifique à l'espèce dont il a la charge. En cas de modification de l'espèce ou du groupe d'espèces dans la procédure, il devra suivre le module complémentaire adapté à ce nouveau groupe d'espèces.

La formation réglementaire doit également être adaptée aux procédures réalisées. Par exemple si de la chirurgie est incluse dans le protocole, une formation aux soins pré et post-opératoires, à l'asepsie, à l'anesthésie et à l'analgésie sera obligatoire. Ceci est valable pour les concepteurs ainsi que pour la ou les personnes qui réalisent les interventions. Les chirurgiens, chirurgiens-dentistes ou vétérinaires sont exemptés de ce module complémentaire (67).

En cas de formation suivie dans l'Union Européenne, en Norvège ou en Suisse, celle-ci peut être reconnue après validation d'un module spécifique à la réglementation française d'une formation approuvée par le ministère de l'agriculture.

Les formations obtenues hors Union Européenne ne sont pas reconnues mais certains modules peuvent être validés après une vérification de maîtrise des connaissances par un responsable pédagogique.

C-2-2 : La formation continue

La formation continue concerne tous les personnels quelle que soit leur fonction. Elle comprend 21 heures de formation, correspondant à 3 jours répartis sur une période glissante de 6 ans.

Cette formation permet le maintien et l'actualisation des connaissances. Les thèmes traités doivent obligatoirement intégrer l'éthique appliquée à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques, le bien-être animal et /ou les 3R :

- tous les thèmes généraux liés à l'utilisation des animaux : bien-être animal, 3R, comportement, physiologie animale, conditions d'hébergement, de transport, contrôles sanitaires, choix du modèle, statistiques, méthodes alternatives, justification de l'utilisation des animaux, réglementation,
- les thèmes spécifiques : technique particulière, méthode chirurgicale..., répondant aux critères d'innovation /évolution de technique et pouvant contribuer de manière positive aux 3R et/ou au bien-être animal,
- les gestes techniques nouveaux à condition que leur mise en application favorise l'éthique, le bien-être animal et/ou les 3R.

Elle est réalisable sur site, à condition de ne pas se limiter aux seules formations internes, ou hors site, avec l'approbation du responsable du suivi des compétences. Elle peut se faire par le biais de formations pratiques, théoriques, de colloques ou même d'e-learning à condition que celui-ci ne dépasse pas 1/3 du volume horaire de la formation.

La présence à la formation est validée par une attestation de présence à l'événement qui sera consigné dans un livret de compétences individuel qui comprend :

- la compétence acquise,
- le mode d'acquisition,
- la date et la durée de la formation,
- la date de validation de la formation.

Ce livret peut être soumis à contrôle lors des visites d'agrément ou des inspections par des agents de la DDPP (68).

C-2-3 : La validation des compétences

La validation des compétences se fait sous forme de tutorat par une personne expérimentée, reconnue experte dans son domaine. Le rôle de ce tuteur est de former et de valider les acquis de l'apprenant sur les gestes techniques nécessaires à son poste. Chaque établissement doit désigner un responsable du suivi des compétences. Celui-ci est en charge du contrôle du niveau d'études, des compétences et de la formation continue adaptée aux protocoles en cours du personnel jusqu'à l'acquisition de l'autonomie de celui-ci. Il doit en outre tenir à jour un tableau de suivi permettant de s'assurer que le personnel dispose d'un niveau d'études, de compétences et d'une formation continue adéquats. Il doit également tenir à la disposition des agents de contrôle habilités tous les éléments permettant de vérifier que les compétences des personnels correspondent à la fonction exercée. L'apprenant ne pourra travailler seul qu'après la validation de ses acquis par son tuteur, au maximum un an après sa prise de fonction.

Déjà en place dans de nombreux établissements, ce tutorat entre maintenant dans un cadre légal.

L'absence de formation (réglementaire et/ou continue) peut constituer une non-conformité lors de la visite d'agrément de l'établissement et impacter l'obtention ou le renouvellement de l'agrément, voire entraîner la fermeture de l'établissement avec une contravention de 4e catégorie (jusqu'à 750 €) pour le responsable de l'établissement et les personnes non formées. (69).

L'annexe VI nous montre le récapitulatif de ces formations et de la réglementation.

C-3 : Demande d'autorisation d'un protocole expérimental

En vertu de la directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, « aucun projet n'est exécuté sans avoir reçu une évaluation favorable du projet par l'autorité compétente », autorisation accordée par le ministre chargé de la recherche (art. R214-122 du code rural), après une évaluation éthique favorable.

On définit par projet tout programme de travail répondant à un objectif scientifique défini, utilisant un ou plusieurs modèles animaux et impliquant une ou plusieurs procédures expérimentales (procédure simple ou complexe).

Cette autorisation se demande avant de commencer le projet, par l'utilisateur ou la personne responsable du projet, à partir du moment où il y a utilisation d'animaux, d'embryons à partir du 3ème tiers de gestation ou d'embryons prélevés après anesthésie ou euthanasie de la mère gestante. Elle est donnée pour une durée maximale de 5 ans et si le

projet venait à subir des modifications, il fera l'objet d'une demande de modification du dossier ou d'un nouveau dossier.

Les informations fournies doivent être complètes, correctes, à jour et pertinentes au risque de retarder la mise en œuvre du projet.

Les unités de recherche doivent maintenant utiliser certains outils mis à leur disposition leur permettant de remplir au mieux leur dossier (fichier APAFIS : Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques). Un modèle a deux objectifs principaux : faciliter la fourniture d'informations et inciter le chercheur à envisager tous les éléments des travaux scientifiques.

C-3-1 : Les instances aptes à procéder aux évaluations

La réalisation d'un projet qui inclut l'utilisation d'animaux nécessite une autorisation accordée par le ministère chargé de la recherche (70). Cette autorisation n'est délivrée qu'après une évaluation éthique du projet par un comité d'éthique en expérimentation animale (CEEA).

Afin d'encadrer et de faire évoluer la recherche qui implique des modèles animaux, la France s'est dotée d'une commission nationale d'expérimentation animale (CNEA) dès 1987, rebaptisée commission nationale pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (71), et d'un comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale (CNREEA) en 2005.

Le rôle de la CNEA, placée auprès des ministres chargés de la Recherche et de l'Agriculture et dont le secrétariat est assuré par le ministère de la Recherche, est de donner des avis sur tout projet de modification de la réglementation ou de la législation relative à l'expérimentation animale, et sur l'approbation des formations réglementaires à destination des personnels des établissements d'expérimentation animale.

Placé auprès de la CNEA, le CNREEA a pour mission d'émettre des avis sur les questions éthiques soulevées par l'expérimentation animale. L'une de ses premières actions a été d'élaborer la Charte Nationale (76) portant sur l'éthique de l'expérimentation.

Les modalités de dépôt de la demande sont précisées dans un arrêté d'application.

D'autres instances consultatives interviennent à d'autres niveaux :

- les conseils régionaux qui agissent au niveau des régions,

- les comités d'examen locaux qui agissent sur une zone géographique plus restreinte,

- le comité d'examen de l'établissement qui joue un rôle dans la contribution aux demandes d'autorisation et dans leur amélioration.

C-3-2 *:* Les principes d'une procédure efficace

Pour que l'évaluation du projet scientifique soit menée au mieux, certains principes se doivent d'être respectés :

- la disponibilité d'experts scientifiques et techniques qualifiés,

- l'impartialité et l'absence de conflit d'intérêt,

- la proportionnalité,

- la cohérence,

- l'efficience,

- la transparence de la procédure,

- l'accès à une procédure de recours,

- la compréhension approfondie du contexte et des critères (analyse dommage/avantage),

- des ressources suffisantes,

- une connaissance de la culture et des pratiques locales dans l'établissement concerné.

Une décision par consensus est considérée comme idéale. Cependant, si un consensus ne peut être trouvé, il est possible que le comité doive recourir à un vote à la majorité. Dans ce cas, les avis divergents doivent être actés.

Les projets expérimentaux autorisés peuvent faire l'objet d'une évaluation rétrospective effectuée par le comité d'éthique dont relève l'établissement utilisateur pour:

- vérifier si les objectifs initiaux ont été réalisés ou pas, si les avantages escomptés ont été obtenus (résultats satisfaisants ou exploitables),

- constater s'il y a eu des modifications dans le protocole, un abandon partiel ou total ou encore un échec du projet,

- s'assurer que les dommages causés aux animaux correspondent à ce qui a été autorisé (nombre d'animaux utilisés, espèces utilisées, gravité des procédures, adéquation des points limites).

Cette évaluation rétrospective est obligatoire pour les procédures de classe sévère et celles impliquant des primates non-humains. Les procédures légères et sans réveil peuvent en être exemptées.

C-3-3 : Exemple d'une demande d'autorisation de procédure

A- INFORMATIONS GENERALES

1. Numéro de version
2. Référence du dossier
3. Titre du projet
4. Durée du projet (années, mois ou jours)
5. Date prévue pour le début du projet (la date doit être donnée en respectant les délais d'obtention de l'autorisation soit 6 à 9 mois ; en général on note « dès qu'il est autorisé »).

B- RESUME NON TECHNIQUE

Le résumé non technique est destiné au grand public, il ne doit donc pas être scientifique mais vulgarisé et simple.

Il doit être anonyme et garantir le respect de la propriété intellectuelle et la confidentialité des informations. Il fournit des informations sur le ou les objectifs du projet, y compris les avantages et dommages attendus, le nombre et les types d'animaux utilisés. Il doit établir clairement et dans le détail comment la règle des 3R est respectée et mise en œuvre.

C- INFORMATIONS ADMINISTRATIVES ET REGLEMENTAIRES

1. Établissement utilisateur : agrément de l'établissement (n° d'agrément, date de délivrance, coordonnées du responsable), noms et coordonnées des responsables de la mise en œuvre du projet, nom et coordonnées du responsable du bien-être animal.

2. Personnel : pour la conception, l'application, les soins aux animaux et la mise à mort.

3. Le projet :

- définir son objectif : requis par la loi (ex: AMM), éducatif (ex : formation) ou scientifique (ex : sous l'égide d'autres autorités telles HCERES, EU, ANR),
- description du projet,
- méthodes de mise à mort éventuellement, pour chaque espèce utilisée et en le justifiant,
- stratégies d'expérimentation ou d'observation utilisées, approche statistique choisie, impact environnemental éventuel.

4. Les animaux :

- justification du recours à l'animal : insuffisance des méthodes in vitro, in silico…
- type d'animaux ou espèce choisis : pertinence du modèle,

- catégorie des animaux utilisés : provenance, modification génétique (si oui préciser s'il y a création, maintien d'une lignée, présence d'un phénotype dommageable),
- origine des animaux de captivité : éleveurs agréés ou non, pays de provenance, animaux réutilisés,
- nombre d'animaux utilisés : par espèce et stade de développement,
- sexe des animaux utilisés : justification, pertinence ou ratio,
- détermination des points limites pour chaque espèce, point à détailler particulièrement.

D- PROCEDURES EXPERIMENTALES

1. Objet visé

- recherche fondamentale,
- recherches transactionnelles ou appliquées (prévention, prophylaxie, diagnostic, traitement de maladies ; évaluation, détection, contrôle de modifications physiologiques chez l'homme, les animaux ou les plantes : bien-être des animaux et amélioration des conditions de production des animaux élevés à des fins agronomiques),
- mise au point, production, essais de qualité, d'efficacité, d'innocuité de médicaments, denrées alimentaires ou autres substances ou produits,
- protection de l'environnement,
- recherche en vue de la conservation des espèces,
- enseignement supérieur ou formation professionnelle ou technique,
- enquêtes médico-légales.

2. Description des procédures

- nom et proposition de classe de sévérité,
- nombre de procédures envisagées (maximum 10),
- description détaillée : nombre d'animaux, de lots d'animaux, prélèvements envisagés (type, fréquence, volume si prise de sang...),
- devenir des animaux en fin de procédure : si mise à mort, nombre d'animaux concernés et idem si gardés en vie.

Dans tous les cas, les experts s'attacheront à la bonne application de la règle des 3R et à l'utilisation autant que possible de méthodes dites alternatives ou de substitution. L'intervention d'un profane extérieur est obligatoire, mais la confidentialité doit être garantie. Le rôle de ce profane est de s'assurer que les préoccupations éthiques et sociétales sont prises en considération, mais pas nécessairement de garantir l'application des 3R, car il est possible que cette personne ne dispose pas des connaissances techniques nécessaires.

Quelle que soit la procédure, l'autorisation de projet n'est possible qu'après une appréciation positive du comité d'éthique.

C-4 : Les comités d'éthique en expérimentation animale

C-4-1 : intérêt et législation

L'éthique est une science morale qui nous amène à nous interroger sur le bien-fondé et la légitimité d'un acte à effectuer. L'évolution des lois (reconnaissance d'une sensibilité des animaux, article 515-14 du code civil en date du 16 février 2015) et des mentalités a conduit à ne plus considérer l'animal de laboratoire comme un simple objet et à respecter les exigences de l'opinion publique en matière de protection animale, en tenant compte de leurs besoins et en évitant un « gaspillage » d'animaux lié à une mauvaise mise en œuvre des procédures.

Par ailleurs, d'un point de vue scientifique, bien traiter les animaux permet d'obtenir des résultats plus significatifs : le stress et de mauvaises conditions d'hygiène pouvant engendrer des variables non négligeables dans les analyses finales.

Le monde de la recherche l'avait compris et avait créé dès 2005 le CNREEA (Comité National de Réflexion Ethique en Expérimentation Animale). Le cadre législatif a ensuite été posé par la directive 2013/63/UE.

Les comités d'éthique sont des instances consultatives mises en place pour promouvoir l'ensemble des principes et pratiques éthiques en expérimentation animale (article R 214-117 à R 214-121 du code rural et de la pêche maritime). Ils sont présents pour répondre à la demande des chercheurs, de certains éditeurs scientifiques et d'agences de financement de la recherche. Leur engagement est de faire respecter, à chaque étape d'un protocole, les principes de « la charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale » (2008) (76).

Un comité d'éthique doit être agréé par le ministère en charge de l'enseignement supérieur et de la recherche et de l'innovation (MESRI).

Chaque comité doit être composé d'au moins 5 membres dans les catégories suivantes:

- une personne justifiant de compétences dans le domaine de la conception de procédures expérimentales et de projets sur les animaux,

- une personne justifiant de compétences dans le domaine de la réalisation de procédures expérimentales sur les animaux,

- une personne affectée à l'entretien et aux soins des animaux,

- un vétérinaire,

- une personne extérieure à l'EEA (Etablissement d'Expérimentation Animale) et témoignant d'un intérêt pour la protection animale.

Le vétérinaire apporte des compétences scientifiques, par exemple au sujet des besoins comportementaux et physiologiques des animaux ou de tout autre besoin lié aux procédures expérimentales.

C'est donc un comité pluridisciplinaire d'experts qui pourra si nécessaire, faire appel à d'autres experts dans des domaines précis. Le recrutement des membres se fait sur la base du volontariat : il s'agit d'un engagement moral. Toute modification dans la composition du comité doit être signalée au ministère. Enfin, le nombre de participant doit être suffisant pour pallier à toute absence ou retrait d'un membre en cas de conflit d'intérêt.

Les comités sont répartis sur tout le territoire et dépendent au niveau national du CNREEA. Ils doivent lui transmettre un bilan annuel de leurs activités. La liste des comités est disponible et mise à jour par le ministère.

C-4-2 : Rôle des comités d'éthique en expérimentation animale (CEEA)

Tous les établissements qui utilisent des animaux à des fins scientifiques (EEA) doivent être rattachés à un CEEA et un seul, par le biais d'une convention. Ces EEA doivent avoir un numéro d'agrément délivré par la DDPP (Direction départementale de la protection de la population).

Les comités sont mis en place pour apprécier la compatibilité entre les procédures expérimentales proposées et les principes éthiques, afin d'aider l'expérimentateur dans sa démarche lorsque le recours à l'animal s'impose, mais ne se substituent pas aux comités scientifiques des établissements. Ils ont pour objet de constituer une garantie complémentaire du respect de la vie animale et du bien-fondé de la demande scientifique.

Les comités ont donc un rôle règlementaire (avis lors des demandes d'autorisation de projet expérimental), et un rôle de conseil (promotion des principes éthiques).Chaque demande d'autorisation de protocole expérimental doit recevoir un avis favorable du comité d'éthique. Ils doivent de ce fait garantir une transparence dans leur décision, une impartialité et une indépendance en évitant tout conflit d'intérêt et une confidentialité quant aux dossiers transmis.

Leur évaluation doit porter sur toutes les facettes du protocole :

- préparation de l'animal,

- choix et utilisation du modèle animal,

- stades douloureux et points limites, en veillant aux différentes solutions proposées pour diminuer ou supprimer la douleur,

- sensibilité de l'espèce choisie (répercussions de l'expérimentation sur l'état physiologique et psychologique des animaux),

- choix des outils statistiques dans le but d'optimiser la méthodologie.

C-4-3 : fonctionnement des comités d'éthique

Pour chaque évaluation, le président doit transmettre le dossier de demande d'autorisation de projet à tous les membres faisant partie du CEEA. Parmi ces membres, le président peut identifier des rapporteurs qui seront chargés de l'analyse initiale du dossier et du dialogue avec le responsable de la mise en œuvre générale de ce projet.

Les membres du CEEA débattent ensuite du projet, sollicitant éventuellement des compléments d'information avant d'émettre leur opinion individuelle. Ces différentes opinions individuelles permettent alors de construire un avis collectif (72).

L'avis d'un comité a une durée de validité maximale de cinq ans. Il doit donc être consulté à nouveau au terme de ce délai, même sans changement de procédure, si le projet dure plus de cinq ans. Cela permet une évaluation rétrospective du projet en cours et la mise en place de nouvelles procédures en fonction de l'avancée des recherches en matière de méthodes alternatives.

Les comités s'engagent à diffuser le plus largement possible les connaissances et les expériences dans ce domaine, y compris les résultats non publiés.

Au sein d'un établissement, le comité d'éthique ne se substitue pas à la Structure de Bien-Etre Animal (SBEA), leurs missions n'étant pas les mêmes. L'annexe VII nous récapitule leurs différentes obligations respectives.

C-5 : Les structures de bien-être animal (SBEA)

C-5-1 : Le bien-être animal

Le bien-être animal peut être défini par l'état dans lequel se trouve un animal quand il peut exprimer les comportements naturels de son espèce et agir selon ses préférences. Cela sous-entend :

- l'absence de blessure, maladie et douleur manifestes,
- l'absence de faim, soif ou malnutrition,
- l'absence de stress (physique, psychologique),

- l'absence de peur, anxiété ou détresse,
- la possibilité d'exprimer le comportement normal de son espèce.

C'est ce que l'on définit comme les 5 piliers du bien-être développés par Broom (73).

Le bien-être animal est une valeur européenne, mise en avant depuis le Traité d'Amsterdam (1997), puis par le traité de Lisbonne (2007).

Ce bien-être passe par les conditions d'hébergement, de transport et les différentes manipulations liées à la réalisation des protocoles expérimentaux.

L'hébergement des animaux doit se faire dans un environnement stable et contrôlé, enrichi en accessoires permettant à l'animal d'exprimer des comportements naturels. Les aliments et l'eau doivent rester à libre disposition. Les animaux seront hébergés en groupe d'individus dont le nombre sera déterminé en fonction des habitudes comportementales de l'espèce concernée. La dimension des logements est établie suivant les espèces dans la directive 2010/63/EU.

C-5-2 : <u>cadre légal</u>

Selon l'article 31 de la directive européenne 2010/63/EU, tout établissement utilisateur, fournisseur ou éleveur d'animaux doit se doter d'une structure chargée du bien-être des animaux.

Cette structure comprend au moins la ou les personnes en charge du bien-être des animaux, de leurs soins et, dans le cas d'un utilisateur, un scientifique. Elle bénéficie aussi des conseils d'un vétérinaire désigné.

Les petites structures peuvent en être exemptées, mais doivent pouvoir bénéficier de l'avis d'experts extérieurs.

La composition et l'activité de la SBEA sont contrôlées par la DDPP.

Les SBEA sont conseillées par la CNEA qui harmonise les activités des différentes SBEA au niveau national (Art. R214-131). La CNEA a récemment changé de nom (décret 2020-274, mars 2020) et s'appelle désormais : Commission nationale pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

C-5-3 : <u>structure et rôle</u>

a- structure

Au minimum la SBEA comprend la personne responsable des animaux (animalier), un scientifique et le vétérinaire en charge dans la structure (53). Le nombre de membres dépend :

- de la nature de l'établissement (élevage/unité de recherche, université/industrie, secteur privé/secteur public),
- de la taille de l'établissement (nombre et complexité des unités animalières),
- du nombre de membres du personnel,
- du domaine de recherche,
- du nombre et du type des projets expérimentaux,
- du nombre d'animaux et d'espèces utilisés,
- de la structure et organisation institutionnelle,
- des ressources financières allouées,
- des missions et tâches supplémentaires attribuées à la SBEA.

Dans les grands établissements, la SBEA peut se scinder en sous-groupes spécialisés, comme par exemple un groupe dédié à l'enrichissement environnemental.

Chaque membre doit disposer d'un niveau approprié de connaissance, de compréhension et d'expertise dans des domaines essentiels. Les compétences nécessaires sont variables en fonction des études menées. L'article 26 de la directive 2010/63/EU prône une augmentation de l'effectif affecté à la SBEA de manière à garantir que tous les aspects de l'utilisation des animaux soient couverts (74). Un recours ponctuel à des experts extérieurs indépendants reste possible pour couvrir des compétences particulières (comportementaliste, expert en technologie de remplacement...).

Un effectif large permet de prodiguer plus de conseils, de sensibiliser d'avantage le personnel et de créer des sous-groupes plus spécialisés. En revanche, il nécessitera une meilleure gestion des ressources humaines, entraînera une lourdeur administrative et une dilution des responsabilités. L'équilibre entre les différentes compétences sera plus difficile à maintenir tout comme la confidentialité. L'accent doit alors être mis sur la communication entre les différents acteurs par le biais de réunions, courriels... Il faut favoriser une approche collaborative, collégiale et sans confrontation entre les scientifiques et le personnel chargé des soins.

b- Rôle de la SBEA

Un cahier des charges est mis en place afin d'attribuer clairement les rôles et responsabilités de chacun.

Tous les documents relatifs aux décisions prises et aux conseils prodigués doivent être conservés pour une durée de 5 ans et doivent pouvoir être consultés sur demande des inspecteurs en cas de contrôle ou audit.

Les tâches de la SBEA sont clairement détaillées par la loi :

1. conseiller le personnel qui s'occupe des animaux sur des questions relatives au bien-être dans le cadre de l'acquisition, de l'hébergement, des soins et de l'utilisation des animaux,
2. conseiller le personnel sur l'application des exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, et le tenir informé des développements techniques et scientifiques relatifs à l'application de ces exigences,
3. établir et réviser les processus opérationnels internes de contrôle, de rapport et de suivi en ce qui concerne le bien-être des animaux hébergés ou utilisés dans l'établissement,
4. suivre l'évolution et les résultats des projets en tenant compte des effets sur les animaux utilisés, en recensant les éléments qui contribuent au remplacement, à la réduction et au raffinement et en fournissant des conseils en la matière,
5. échanger des informations avec les responsables de la mise en œuvre générale des projets en vue d'une éventuelle demande de modification des autorisations de projet,
6. fournir des conseils sur les programmes de placement des animaux, y compris sur la nécessité de les socialiser avant le placement.

Les conseils donnés ainsi que les décisions prises par la SBEA, sont consignés dans des documents qui doivent être conservés pendant au moins trois ans. Ces mêmes documents doivent également être mis à la disposition de l'autorité compétente à la demande de celle-ci lors des contrôles.

Le but ultime d'une SBEA est de promouvoir une culture de soin adéquate, avec le bien-être animal au centre de ses préoccupations. Elle permet aussi d'assurer la communication entre les scientifiques et les techniciens chargés des soins aux animaux, entre les scientifiques et le grand public et de gagner la confiance de celui-ci en présentant les avancées faites en matière de bien-être animal.

Sa mission est complémentaire de celle du comité d'éthique car c'est une structure « de terrain » : elle est interne à l'établissement, elle assure le suivi des projets tout au long de leur réalisation et s'assure du bien-être des animaux tout au long de leur vie (approvisionnement, entretien, hébergement et devenir).

C-5-4 : Les comités nationaux

Chaque état membre de l'Union Européenne établit un comité national. Ces différents comités échangent sur le fonctionnement des SBEA, sur l'évaluation des projets et partagent les meilleures pratiques au sein de l'Union. Leur création date de 2014.

Un comité national regroupe tous les établissements de l'état membre. Il assure la cohérence au niveau national, conseille les SBEA lors des différentes procédures (acquisition, soins, élevage, utilisation), partage les bonnes pratiques et diffuse les informations.

Il se compose d'experts en différentes compétences (comportement animal, expertise vétérinaire, expertise en matière d'espèces, en science, éthique, en solution de remplacement, en conception de protocoles, en législation et protection animale) en respectant un équilibre entre scientifiques, associations de protection animale et grand public pour garantir sa crédibilité. Les différents membres sont indépendants, nommés sur la base de leur compétence.

Les comités nationaux ont des tâches essentielles et des tâches supplémentaires facultatives.

Les tâches essentielles sont :

- être des points de contact et de soutien aux SBEA,
- promouvoir les 3R,
- prodiguer des conseils aux autorités compétentes,
- échanger des informations/évaluation sur un projet afin de faciliter une approche cohérente et harmonisée à l'échelon national,
- proposer des orientations sur des thèmes spécifiques,
- partager les informations avec les autres états membres (forum de discussion des différents présidents de comité : CIRCABC).

Les tâches supplémentaires sont :

- l'éclairage du débat public sur l'utilisation des animaux à des fins scientifiques,
- le partage de différents points de vue sur les projets de règlementation et d'orientation,
- la formulation de suggestions pour les thèmes et domaines de recherches futures liées à l'utilisation d'animaux,
- la consultation sur la mise en œuvre du cadre d'enseignement et de formation,
- l'adoption de dispositions nationales à la suite de la transposition de la directive.

Conclusion :

A l'heure d'aujourd'hui peut-on se passer de l'expérimentation animale ? Non, « si des méthodes alternatives ou de substitution existent, rien ne peut encore remplacer la recherche animale pour faire progresser la recherche biologique et médicale » (75). Les éléments à reproduire dans les recherches sur des processus pathologiques sont trop complexes pour être reproduits sur des modèles simplifiés.

Si le nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale a diminué ces dix dernières années, on aurait pu penser qu'avec les innovations de ces cinquante dernières années la baisse aurait été plus significative. Mais la médecine progresse toujours et les recherches sur des maladies du monde moderne tels la maladie d'Alzheimer ou les cancers sont « consommatrices » d'animaux. Même si les techniques scientifiques font d'énormes progrès, rien pour le moment, et pour des années encore, ne permettra de se passer complètement du modèle animal.

L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques reste un sujet de société sensible qui suscite de nombreux débats et questionnements. La société est-elle prête à se passer des progrès en médecine sur des maladies qui sont de plus en plus présentes du fait de l'allongement de la durée de vie au nom de la protection animale ? Probablement pas, mais il est évident qu'il faut respecter la vie des animaux de laboratoire, améliorer leurs conditions de vie, favoriser les bonnes pratiques en minimisant leur utilisation et en privilégiant leur réhabilitation.

Comme disait Gandhi : « On peut juger de la grandeur d'une nation et ses progrès moraux par la façon dont elle traite les animaux ». Il faut continuer à améliorer le sort des animaux utilisés à des fins scientifiques même si de par le fait de les « utiliser » va l'encontre de leur bien-être.

ANNEXES

Annexe I : différentes lignées cellulaires

Lignée	Nom complet	Espèce	Tissu d'origine	Référence
3T3		murine	fibroblaste[1]	Cellosaurus [archive]
AtT20		murine	tumeur hypophysaire corticotrope	Cellosaurus [archive]
Caco-2		humaine	cancer du colon	Cellosaurus [archive]
Calu-3		humaine	cancer du Poumon (épithélium)	
CHO	Chinese hamster ovary	hamster	épithélium ovarien	Cellosaurus [archive]
COS-7	Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40	singe *Cercopithecus aethiops*	fibroblaste rénal	Cellosaurus [archive]
GH3		rat	tumeur hypophysaire somatotrope	Cellosaurus [archive]
HEK-293	Human embryonic kidney	humaine	épithélium rénale embryonique	Cellosaurus [archive]
HeLa	Henrietta Lacks	humaine	Cancer du col utérin	Cellosaurus [archive]
HT29		humaine	cancer du colon	Cellosaurus [archive]
HL-60	Human leukemia	humaine	myélome	Cellosaurus [archive]
HT-29		humaine	adénocarcinome de l'épithélium colique	Cellosaurus [archive]
Jurkat		humaine	lymphome de lymphocyte T	Cellosaurus [archive]
LNCap	Lymph node Cancer of the Prostate	humaine	adénocarcinome épithélial de la prostate	Cellosaurus [archive]
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7	humaine	cancer du sein	Cellosaurus [archive]
MDA-MB-231	M.D. Anderson - Metastatic Breast	humaine	cancer mammaire	Cellosaurus [archive]
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney	canine	épithélium rénal	Cellosaurus [archive]
MRC-5	Medical Research Council cell strain-5	humaine	fibroblaste de poumon embryonnaire	Cellosaurus [archive]
NIH-3T3		murine	fibroblaste embryonique	Cellosaurus [archive]
PC12		rat	phéochromocytome	Cellosaurus [archive]
Saos-2		humaine	ostéosarcome	Cellosaurus [archive]
Sf9	*Spodoptera frugiperda*	insecte	ovaire	Cellosaurus [archive]
Sf21	*Spodoptera frugiperda*	insecte	ovaire	Cellosaurus [archive]
S2	*Drosophila* Schneider 2	drosophile	embryon de drosophile	Cellosaurus [archive]
T-47D		humaine	carcinome ductal de la glande mammaire	Cellosaurus [archive]
U2OS		humaine	ostéosarcome	Cellosaurus [archive]
U87	*Uppsala 87 Malignant Glioma*	humaine	glioblastome	Cellosaurus [archive]
Vero		simienne	épithélium rénal de singe vert	Cellosaurus [archive]

Annexe II : Classification des expériences sur animaux selon leur degré de gravité (catégories de contrainte) (source INRA)

1 Sans contrainte: degré de gravité 0

Interventions et manipulations sur des animaux dans un but expérimental qui n'occasionnent aux animaux **aucune** douleur, **aucun** mal ou dommage, qui ne provoquent **pas** de grande anxiété et qui ne perturbent **pas** notablement leur état général. Des expériences sur animaux selon article 12 de la LPA avec degré de gravité 0 sont classées comme expériences **non soumises à autorisation**. Ces expériences doivent toutefois être annoncées (cf. art. 62, 1er al., OPA).

Exemples de la pratique vétérinaire: Prise de sang à but diagnostique; Injection sous-cutanée d'un médicament.

2 Contrainte légère: degré de gravité 1

Interventions et manipulations sur des animaux dans un but expérimental qui occasionnent aux animaux une **contrainte légère et de courte durée** (douleurs ou dommages).

Exemples de la pratique vétérinaire: Injection d'un médicament avec contention; Castration de mâles sous narcose.

3 Contrainte moyenne: degré de gravité 2

Interventions et manipulations sur des animaux dans un but expérimental qui occasionnent aux animaux une **contrainte moyenne** et de **courte durée** ou une **contrainte légère de durée moyenne à longue** (douleurs, maux ou dommages, grande anxiété ou trouble notable de l'état général).

Exemples de la pratique vétérinaire: Traitement opératoire d'une fracture d'un membre; Stérilisation de femelles.

4 Contrainte sévère: degré de gravité 3

Interventions et manipulations sur des animaux dans un but expérimental qui occasionnent aux animaux une **contrainte sévère à très sévère** ou une **contrainte moyenne de durée moyenne à longue** (grandes douleurs, douleurs persistantes ou dommages importants, anxiété importante et persistante ou trouble important et persistant de l'état général).

Annexe III : documents de traçabilité

Annexe IIIa : fiche individuelle de traçabilité (55)

Caractéristiques principales de l'animal cédé

Nom scientifique : Nom vernaculaire – Race :

Numéro d'identification (*puce et/ou tatouage*) + Nom :

Date de naissance :

Sexe : Poids : Couleur (facultatif) :

Caractéristiques complémentaires

- **Vaccination (**Types de vaccins, dates des dernières injections) :

.....

.....

.....

- **Stérilisation :** Oui / Non *Si oui, date de la stérilisation* :

- **Informations sanitaires** (traitements administrés, etc.) :

.....

.....

- **Conditions de vie au Laboratoire** (vie sociale, accès extérieur, enrichissements, etc.) :

.....

.....

- **Protocole(s) auxquels ont participé les animaux au Laboratoire** (information à destination du grand public, adoptants et refuges) :

.....

.....

- **Recommandations particulières** :

.....

.....

Documents remis

Certificat vétérinaire de bonne santé :

Documents attestant la propriété :

Autres documents remis :

Fait le .....à .....

Pour le Laboratoire :

Nom :
Qualité :
Signature :

Pour le Graal :

Nom :
Qualité :
Signature :

Annexe IIIb : certificat de bonne santé (55)

CERTIFICAT VETERINAIRE DE BONNE SANTE

Je soussigné, Dr. (*Nom du vétérinaire*), certifie que les 10 chiens beagle suivants:

Numéro de puce électronique	Sexe	Date de naissance	Numéro de puce électronique	Sexe	Date de naissance
941xxxxxxxxxxx	F	08/02/15	941xxxxxxxxxxx	F	27/02/15
941xxxxxxxxxxx	F	23/07/14	941xxxxxxxxxxx	F	24/02/15
941xxxxxxxxxxx	F	24/05/14	941xxxxxxxxxxx	F	21/02/15
250xxxxxxxxxxx	F	09/05/14	941xxxxxxxxxxx	F	19/02/15
941xxxxxxxxxxx	F	01/05/14	941xxxxxxxxxxx	F	11/02/15

- Sont en bonne santé
- Ne présentent aucun danger pour la santé publique, la santé animale ou l'environnement
- Sont actuellement hébergés dans des conditions répondant aux besoins de l'espèce et satisfaisant leur bien-être
- Ont été socialisés à l'homme et à leurs congénères et présentent un comportement compatible avec une adoption.

Pour valoir ce que de droit,

Le

Nom et signature du responsable

Annexe IIIc : Document de cession (55)

Nom et coordonnées (adresse, tél., mail) du laboratoire :

.....

.....

Les animaux suivants sont cédés par le Laboratoire au GRAAL, à titre gratuit,

en date du :

N° Fiche*	N° I-CAD	Sexe	Date de naissance	Lieu de naissance	Race

Le GRAAL s'engage à céder ensuite à titre gratuit les animaux à la structure d'accueil suivante :

Nom et coordonnées de la structure d'accueil : (*Elles vous seront communiquées par le GRAAL*)

.....

.....

.....

Documents à adresser par le laboratoire au GRAAL :

- Fiche de traçabilité individuelle par animal
- Certificat vétérinaire de bonne santé
- Autorisation de placement validée par la DDPP
- Document attestant la propriété

Pour le GRAAL	**Pour le laboratoire**
Nom :	Nom :
Qualité :	Qualité :
Date et signature :	Date et signature :

Annexe IV : LES STATUTS SANITAIRES DES ANIMALERIES

Animalerie A1

Animalerie dite conventionnelle

Animalerie A2

Objectif : protéger l'environnement

Pression d'air : dépression des locaux

Filtration : filtration de l'air extrait

Equipement : PSM type 2

Autoclave : autoclave à proximité dans le bâtiment

Animalerie A3

Objectif : protéger l'environnement et protéger les animaux

Pression d'air : dépression des locaux

Etanchéité : possibilité de fermeture hermétique des locaux pour désinfection chimique

Filtration : filtration de l'air entrant et filtration de l'air extrait au moyen de filtre HEPA

Autoclave : autoclave double entrée connecté directement sur les locaux confinés

Outre ces classes réglementaires, nous pouvons définir une classe intermédiaire adaptée à la conservation d'un statut sanitaire " propre " (c'est-à-dire exempt d'agents pathogènes) des animaux et des protocoles à mettre en œuvre

Animalerie A1+

pour animaux EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques)
Objectif : protéger les animaux
Pression d'air : surpression des locaux à protéger
Filtration : filtration au moyen de filtres HEPA de l'air admis et extrait
Autoclave :
autoclave double entrée connecté directement sur les locaux à protéger

Annexe V: exemples de grille de score

Annexe Va : grille de score générale

PARAMÈTRE	N° ANIMAL :	NOTE	DATE/ HEURE	DATE/ HEURE
APPARENCE	Normale	0		
	Manque de toilettage	1		
	Pelage terne, écoulements nasaux et lacrymaux	2		
	Piloérection, dos arrondi	3		
ABREUVEMENT ET ALIMENTATION	Normal	0		
	Incertain : perte de poids < 5%	1		
	Diminution : perte de poids 0-15%	2		
	Aucune prise d'aliment ou d'eau	3		
EXAMEN CLINIQUE	T, FC et FR normales	0		
	Faibles modifications	1		
	T+/- 1°C, FC et FR +30%	2		
	T+/-2°C, FC et FR +50% ou très faible	3		
COMPORTEMENT NATUREL	Normal	0		
	Légères modifications	1		
	Moins mobile et attentif, isolé	2		
	Vocalisations spontanées, automutilation, animal agité, ou immobile.	3		
COMPORTEMENT PROVOQUÉ	Normal	0		
	Dépression mineure ou réponse exagérée	1		
	Changements modérés par rapport à ce qui est attendu	2		
	Réaction violente ou très faible et pré-comateuse	3		
AJUSTEMENT DU SCORE	Si un score 3 est noté plus d'une fois, ajouter un point pour chaque 3	2-5		
	Total	0-20		

0-4	Normal
5-9	Observer attentivement, envisager l'utilisation d'antalgiques
10-14	Souffrance, prévoir un mode de soulagement et observer régulièrement. Demander un deuxième avis. Considérer l'euthanasie.
15-20	Souffrance sévère. Le protocole expérimental ne doit-il pas être modifié ?

Annexe Vb : grille de score adaptée

Variables liées aux réponses et système d'évaluation quantitative

Changement de poids corporel.

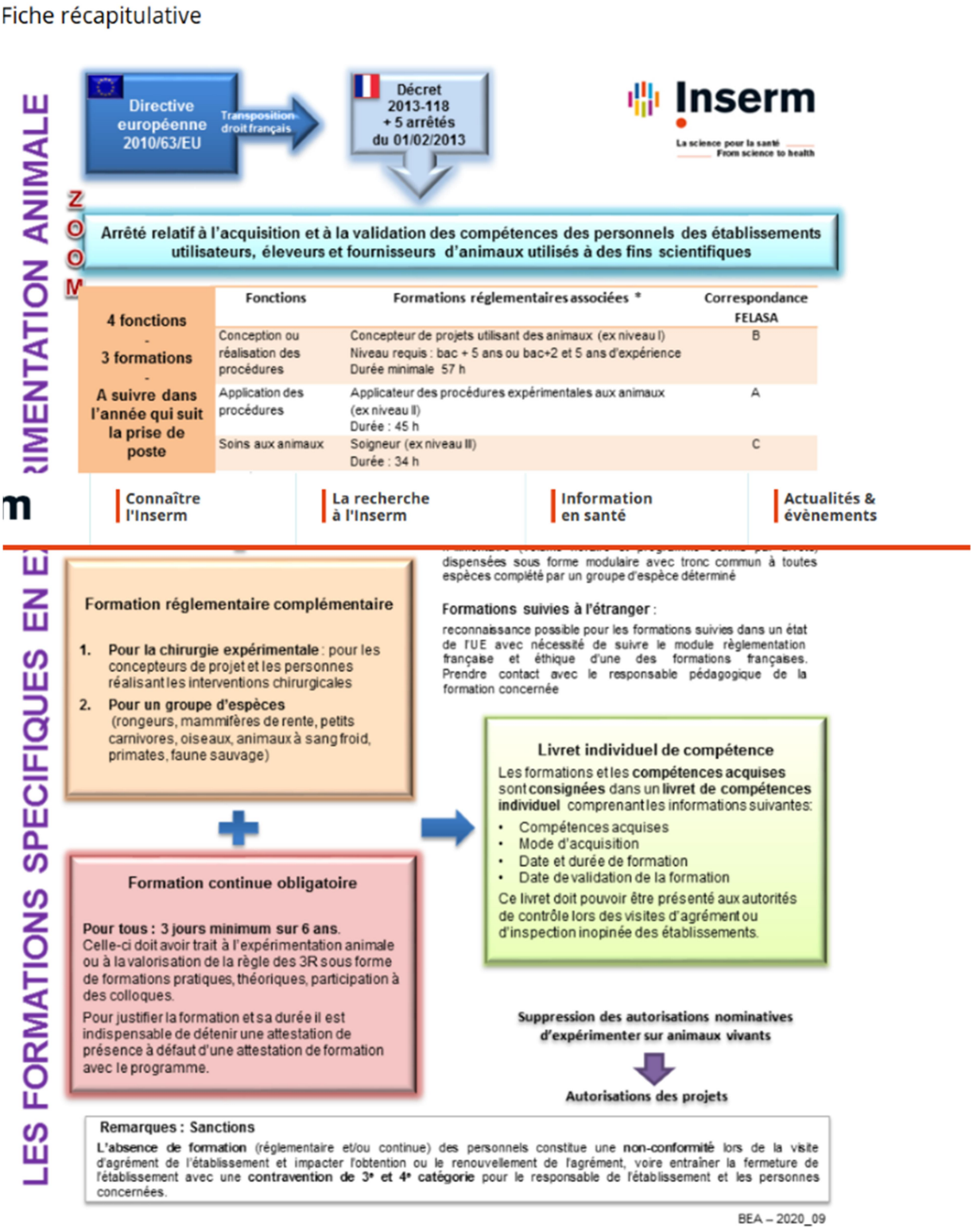
0	Normal
1	Perte de poids < 10 %
2	Perte de poids entre 10 et 20 %
3	Perte de poids > 20 %.

Apparence physique.

0	Normale
1	Anémie (couleur pâle des yeux)
2	Anémie, et sang dans les fèces, diarrhée et/ou petites boules de matières fécales
3	Les signes ci-dessus ainsi qu'un gonflement au niveau de l'abdomen
4	Poils ébouriffés, absence de toilettage, posture anormale.

Évaluation du point limite : Si la perte de poids excède 15 % comparaison faite avec les animaux témoins, et si les animaux ne sont pas euthanasiés immédiatement, des analgésiques leur sont administrés jusqu'à la fin de l'expérience. Tout animal auquel est attribuée une valeur totale égale à quatre ou plus est euthanasié et une autopsie est faite afin d'évaluer la masse tumorale et de prendre des échantillons de tissus.

Annexe VI : les formations spécifiques en expérimentation animale
(Acquisition et validation des compétences des personnels, INSERM)



Annexe VII : les missions des SBEA et CEEA

Tableau comparatif des missions obligatoires respectives du comité d'éthique en expérimentation animale (CEEA) et de la structure chargée du bien-être des animaux (SBEA), ainsi que des activités complémentaires du CEEA.

Missions obligatoires du CEEA

- Procéder à une évaluation éthique des projets et rendre un avis au ministère chargé de la recherche en vue de leur autorisation préalablement à leur mise en œuvre
- Effectuer une appréciation rétrospective des projets d'expérimentation animale pour lesquels elle est requise
- Établir un bilan annuel d'activité et le transmettre au CNREEA
- Prendre en compte les recommandations du CNREEA
- Répondre aux audits menés par le ministère chargé de la recherche

Activités complémentaires du CEEA identifiées dans la Charte nationale

- Être un lieu de dialogue et de réflexion
- Participer à la promotion des principes éthiques
- Diffuser les connaissances et l'expérience acquises en matière d'expérimentation animale et de méthodes alternatives, y compris dans le cas de résultats non publiés

Missions obligatoires de la SBEA

- Conseiller le personnel qui s'occupe des animaux sur des questions relatives au bien-être des animaux dans le cadre de l'acquisition, de l'hébergement, des soins et de l'utilisation d'animaux
- Conseiller le personnel sur l'application des exigences de remplacement, de réduction et de raffinement et le tenir informé des développements techniques et scientifiques relatifs à l'application de ces exigences
- Établir et réviser les processus opérationnels internes de contrôle, de rapport et de suivi en ce qui concerne le bien-être des animaux hébergés ou utilisés dans l'établissement (par exemple, en effectuant des visites de terrain)
- Suivre l'évolution et les résultats des projets en tenant compte des effets sur les animaux utilisés, en recensant les éléments qui contribuent au remplacement, à la réduction et au raffinement, et en fournissant des conseils en la matière
- Échanger des informations avec les responsables de la mise en œuvre générale des projets en vue d'une éventuelle demande de modification des autorisations de projet
- Fournir des conseils sur les programmes de placement des animaux, y compris sur la nécessité de socialiser les animaux à placer
- Mettre à disposition des inspecteurs, à leur demande, les documents relatifs aux conseils donnés et aux décisions prises. Conserver ces documents pendant cinq ans

Liste des abréviations

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANR : Agence Nationale de la recherche

APAFIS : Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des FIns Scientifiques

CAAD : Computer Aid Drugs Discovery

CCPA : Conseil Canadien de Protection Animale

CEE : Conseil économique Européen

CEEA : Comité d'Ethique en Expérimentation Animale

CEAV SMAL : Certificat d'Etudes Approfondies Vétérinaires en Sciences et Médecine des Animaux de Laboratoire

CIRCABC : Communication and Information Resource Center for Administrations,Business and Citizens

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CNEA : Commission Nationale de l'Expérimentation Animale

CNREEA : Comité National de Réflexion Ethique en Expérimentation Animale

CNSPA : Confédération Nationale des SPA de France

DESV SMAL : Diplôme d'Etudes Spécialisées Vétérinaires en Sciences et Médecine des Animaux de Laboratoire

DDPP : Direction Départementale de la Protection des Populations

ECHA : European CHemical Agency

ECOPA : European COnsensus Plateform on Alternatives

ECVAM : European Center for the Validation of Alternatives Methods

EDQM : direction européenne de la qualité du médicament et soins de santé

EEA : Etablissement d'Expérimentation Animale

EUROoCS : European Organ-on-chip Society

FELASA : Fédération Européenne des Associations des Animaux de Laboratoire

FDA : Food and drug administration

FRANCOPA : plateforme française de ECOPA

GIRCOR : Groupe Interprofessionnel de Réflexion et de COmmunication sur la Recherche

GIS : Groupement d'Intérêt Scientifique

GRAAL : Groupement de Réflexion et d'Action pour l'AnimaL

HCERES : Haut Conseil de l'Evaluation de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur

IFOP : Institut Français de l'Opinion Publique

INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

MESRI : Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et de l'Innovation

NAC : Nouveaux Animaux de Compagnie

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique

OPECST : Office Parlementaire d'Evaluation des Choix Scientifiques et Technologiques

ORCHID : ORgan on a CHip in Developpment

OSOR : One Substance One Registration

(Q)SAR : (Quantitative) Structure-Activity relationships

REACH : Registration, Evaluation and Autorisation of CHemicals

RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire

SBEA : Structure de Bien-Être Animal

SPA : Société Protectrice des Animaux

TEP : Tomographie par Emission de Positons (PET : Positon Emission Tomography)

Liste des figures :

Fig.1 : utilisation des animaux en expérimentation animale, répartition selon les espèces (enquête statistique 2018 du ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation).

Fig.2 : répartition des espèces suivant la classe de sévérité des procédures (enquête statistique 2018 du ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation).

Fig.3 : réutilisation des animaux suivant l'espèce (enquête statistique 2019 du ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation).

Fig.4 : choix de la molécule en fonction de la douleur (source : la douleur de l'animal au cours d'une expérimentation, biosit.univ-rennes1.fr).

Fig.5 : les acteurs de l'évaluation du bien-être animal (Observation et suivi des animaux de laboratoire : bonnes pratiques au quotidien AFSTAL juin 2011).

Fig.6 : le processus de validation (les méthodes alternatives en expérimentation animale, INERIS références, décembre 2013).

Fig.7 : épiderme humain in vivo/in vitro (Etat des lieux des méthodes alternatives dans le domaine de l'expérimentation animale, Francopa 2012).

Fig.8 : Cellules de la lignée d'une des plus anciennes cultures de cellules humaines, provenant de Henrietta Lacks, morte du cancer, et dont une lignée de cellule continue à être cultivée. (cdn. futura-sciences.com).

Fig.9 : Schéma d'un blastocyste de 5 jours (0,14 mm) (les cellules souches,Planet-Vie).

Fig.10 : les cellules souches, la différenciation cellulaire (Albert Barrois : les basiques de la thérapie cellulaire).

Fig.11 : des cellules souches aux organoïdes (©Betty Lafon / Sciences et Avenir).

Fig.12 : exemples d'images IRM (UMIquiz).

Fig.13 : exemple d'appareil IRM vétérinaire (© 2020 Randy Kepple Photographs).

Fig.14 : schéma du processus d'acquisition d'une TEP (TEL archives ouvertes).

Fig.15 : spectre électromagnétique (Rayons X dans l'imagerie médicale-E-monsite).

Fig.16 : exemple de scanner (les tumeurs cérébrales E-monsite).

Fig. 17 : description d'un échographe (TPE rayons x et échographie- E-monsite).

Fig.18 : principe de la bioluminescence (Futura- sciences).

Fig.19 : Images de BLI représentatives de différents modèles in vivo (covance).

Fig.20 : E.Monbelli, la modélisation du QSAR (HAL Ineris).

Fig.21 : organe sur puce (Elveflow).

Fig.22 : poumon sur puce (Betty Lafon/sciences et avenir).

Fig.23: Démarche du GRAAL (www.graal-defenseanimale.org).

Fig.24 : placement des animaux (guide la retraite des animaux de laboratoire).

Fig.25 : problèmes rencontrés par les adoptants de chiens (60).

Fig.26 : problèmes rencontrés par les adoptants de chats (60).

Fig.27 : problèmes rencontrés par les adoptants de rats (60).

Fig.28 : provenance des animaux pour l'expérimentation animale.

Fig.29 : formations règlementaires liées à la fonction.

Liste des tableaux :

Tableau 1 : tableau des techniques appropriées en fonction des espèces (https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFARTI000027038011).

Tableau 2 : Réutilisation des animaux en 2014 (61).

Tableau 3 : Réutilisation des animaux en 2018 (61).

Tableau 4 : les différents niveaux de formation et leurs correspondances (65).

Tableau 5 : les compétences acquises et les différentes fonctions (66).

Bibliographie :

1- Lyne LÉTOURNEAU, « De l'animal-objet à l'animal-sujet ? regard sur le droit de la protection des animaux en Occident », Lex Electronica, vol. 10, no 2 (numéro spécial), Automne 2005.

2- Florence BURGAT « La dignité de l'animal : une intrusion dans la métaphysique du propre de l'homme.», in L'Homme, Paris Ed. Ecole des Hautes Etudes en sciences sociales, 161, janvier-mars 2002, pp 197-203.

3- Jean-Pierre DIGARD, « L'homme et les animaux domestiques. Anthropologie d'une passion. » In : Annales. Économies, Sociétés, Civilisations. 46e année, N. 6, 1991. pp. 1494-1496.

4- Chantal AUTISSIER ; Réglementation éthique de l'expérimentation animale en recherche biomédicale, Med Sci (Paris), 2008, Vol. 24, N° 4 ; p. 437-442.

5- Décret n°2001-464 du 29 mai 2001 modifiant le décret n° 87-848 du 19 octobre 1987 pris pour l'application de l'article 454 du code pénal et du troisième alinéa de l'article 276 du code rural et relatif aux expériences pratiquées sur les animaux. JO du 31 mars 2001, n°125 :8682-5.

6- RUSSELL WMS, BURCH RL. 1959. (as reprinted 1992). The principles of humane experimental technique. Wheathampstead (UK) : Universities Federation for Animal Welfare.

7- Fiche INSERM : la règle des 3 R.

8- Festing MF, Baumans V, Combes RD, Halder M, Hendriksen CF, Howard BR, Lovell DP, Moore GJ, Overend P, Wilson MS. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research : problems and possible solutions. Altern Lab Anim. 1998 May-Jun ; 26(3) : 283-301. PMID : 26042346.

9- Règlement REACH, règlement CE N°440/2008 de la commission du 30 mai 2008. JO de l'UE L 142.

10- Rapport au nom de l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques sur « l'utilisation des animaux en recherche et les alternatives à l'expérimentation animale : état des lieux et perspectives », audition publique du 17 janvier 2019, enregistré le 21 mars 2019.

11- EURL ECVAM : Status report on the developpment, validation and regulatory acceptance of alternative methods and approach. 2017.

12- PIGENET Y. : « peut-on se passer des modèles animaux », journal du CNRS, 26 octobre 2017.

13- Yann HERAULT : Directeur scientifique de l'Institut clinique de la souris, à l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (CNRS/Inserm/Université de Strasbourg).

14- DONNARS O. : « l'animal, un modèle nécessaire », transversal n°70, nov/dec 2013.

15- Alfred Henry STUTEVANT, Calvin BLACKMAN, BRIDGES, Thomas Hunt MORGAN, L. V. MORGAN, Ju-Chi Li, *Contributions to the genetics of Drosophila simulans and Drosophila melanogaster*, éd. Carnegie Institution of Washington, 1929.

16- BOYD J (1988) Mice Humane Innovations and Alternatives in Animal Experimentation 3, 98 –9.

17- ADAMS CE. The laboratory rabbit. In : The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals, Sixth edition. Poole TB ed, Longman Scientific & Technical, England, 1987 ; 415-435.

18- X. PENG C. M, LANG C. K, DROZDOWICZ& B. M. OHLSSON-WILHELM BM.: « Effect of cage population density on plasma corticosterone and peripheral lymphocyte populations of laboratory mice ». Lab. Anim.1989;23:302-306.

19- DUNBAR I. : Dog behaviour. « Why dogs do what they do », Neptune,NJ : TFH.Publications, INC.1979.

20- Université de Laval, Théorie animaux de laboratoire, juin 2012.

21- MORTON DB., GRIFFITH PHM. : « Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment », The veterinary Record, 20 avril 1985, 116 : 434-436.

22- SMYTH, D. (1978. Alternatives to Animal Experiments. 218pp. London : Scolar Press.

23- Odette PRAT (CEA, collaboration avec Kallistem) «Fongicides et toxicité testiculaire : recherche des mécanismes et de biomarqueurs potentiels sur une culture cellulaire organotypique de rat ».

24- GIS FRANCOPA : « Etat des lieux des méthodes alternatives dans le domaine de l'expérimentation animale en France ».2010.

25- HANSEN et al. In : Research in microbiology, vol. 142, n°2-3, pp161-167.

26- Leonard HAYFLICK et Paul S. Moorhead, « The serial cultivation of human diploid cell strains », *Experimental Cell Research*, vol. 25, n° 3, décembre 1961, p. 585–62.

27- Petit CA, Gardes MY, Feunteun J. Immortalization of rodent embryo fibroblasts by SV40 is maintained by the A gene. Viro-logy 1983 ; 127 : 74-82.

28- John B. Gurdon and Shinya Yamanaka : The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012 for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent.

29- INSERM « Cellules souches pluripotentes induites » déc. 2019.

30- S. Boers & al., «Organoids as Hybrids: Ethical Implications for the Exchange of Human Tissues»,Journal of Medical Ethics, 2019, vol. 45/2, p. 131-139.

31- G. Rossi & al.,«Progress and Potential in Organoid Research», Nature Reviews, 2018, vol. 19, p.671).

32 - 0. D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. Nat Biotechnol 2005 ; 23 : 1534-41.

33- Marina Simian, Mina J. Bissell; Organoids : A historical perspective of thinking in three dimensions. J Cell Biol 2 January 2017 ; 216 (1) : 31–40.

34- Lavazza A, Massimini M. J Cerebral organoids : ethical issues and consciousness assessment.Med Ethics, (9) : 606-610. MED : 29491041.

35-Bruno Verschuere, GIRCOR : les organoïdes pour remplacer la recherche animale ?, fondation pour l'innovation politique, 9 juillet 2019.

36- P D WALL, W H SWEET: « Temporary Abolition of Pain in Man », Science, 155,1967 ; pp108-109.

37- Hounsfield GN. Computerized transverse axial scanning (tomography) : Part I. Description of system. 1973. *The British Journal of Radiology*. 68 : H166-172. PMID.

38- George McClelland Whitesides : chimiste américain connu pour ses travaux dans les domaines de la résonance magnétique nucléaire (RMN), de la chimie organométallique, de l'auto-organisation moléculaire et des nanotechnologies.

39- S.REY : la bioluminescence, une lumière venue de la mer prête à révolutionner la ville de demain.

40- S.kossodo : Imagerie par bioluminescence : suivi in vivo du développement des tumeurs, de la dissémination de la maladie et de l'efficacité des traitements, Covance, sept 2013.

41- ECHA : Guidance on information requirements and chemical safety assessment, R.6 QSAR and grouping of chemicals.

42- Lewis A, Kazantis N, Fishtik I, *et al.* Integrating process safety with molecular modelling-based risk assessment of chemicals within REACH regulatory framework : benefit and future challenges. *J Hasard Mat* 2007; 142 : 592–602.

43- XU LC, LIU L, REN XM, ZHANG MR, CONG N, et coll. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of some pesticides in vitro. Toxicology. 2008 ; 243 : 59-65.

44- Elias ZERHOUNI, professeur à l'université John Hopkins, leçon inaugurale, 20 janvier 2011.

45- C.Quintard : doctorant en microfluidique, CEA-Leti, Grenoble.

46- D.Ingber : biologiste cellulaire bio-ingénieur, université de Harvard.

47-Journal officiel de l'Union Européenne, directive 2010/63/UE.

48- Sondage Ifop pour la Fondation 30 Millions d'Amis, «Les Français et le bien-être des animaux », 2018.

49- Sondage IPSOS pour One Voice : « les français et l'expérimentation animale », février 2003.

50- Sondage IFOP pour la fédération Croc blanc : « les français et les animaux de compagnie », juillet 2018.

51- Eurobaromètre 2010 commission européenne.

52- LASA : guidance on the rehoming of laboratory dogs.

53- Décret n°2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

54- Ministèrede l'enseignement supérieur et de l'innovation : enquête statistique 2018 sur l'utilisation des animaux à des fins scientifiques.

55- GRAAL/GIRCOR, la retraite des animaux de laboratoire, from lab tohome, 2018.

56- WYRICK BJ (1996). A successful animal adoption program : observations on the animal care facility program at the University of California, San Francisco. Contemp. Top Lab Anim Sci, 35, 43-47.

57- Directive 2010/63 de l'UE, décret 2013-118 du 1er février 2013.

58- Arrêté du 1er février 2013 annexe III, article 26.

59- Article R214-112 du code rural et de la pêche maritime, 7 août 2017.

60- BARTHE Sandrine : « La réhabilitation des animaux de laboratoire », thèse vétérinaire, Toulouse, 2010.

61- Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation : « utilisation des animaux à des fins scientifiques dans les établissements français », enquêtes annuelles.

62- NRC (National Research Council). 1992. *Recognition and Alleviation of Pain and Distress in Laboratory Animals.* Washington DC : National Academy Press.

63- 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.

64- Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques, Légifrance.

65- Instruction technique DGAL/SDSPA/2019-175 du 28 février 2019.

66- Dr V. PARIETTI-MONTCUQUET : « Formations spécifiques à l'expérimentation animale », travail quotidien et mise en œuvre de la directive européenne, 2014.

67- INSERM : acquisition et validation des compétences des personnels.

68- Commission nationale de l'expérimentation animale : « Formation continue : recommandations dans le cadre de la réglementation relative à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques », CNEA, 14 avril 2018.

69- INSERM : les formations spécifiques.

70- Article R214-122 du code rural et de la pêche maritime, 7août 2017.

71- Décret n° 2020-274 du 17 mars 2020 modifiant certaines dispositions relatives à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

72- GIRCOR-GRICE : « règles communes d'organisation et de fonctionnement des comités d'éthique en expérimentation animale », mars 2018.

73- Broom, D.M. (2011). A history of animal welfare science. Acta Biotheoretical, 59, 121-137.

74- Article 26 de la directive 2010/63/EU du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

75- François Lachapelle, président du GIRCOR : CNRS, Le Journal ; N°277, été 2014.

76- Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale mise à jour le 18/12/2014.ù

Toulouse 2021

NOM : HUIBAN **Prénom :** Sylvie

TITRE : Ethique en expérimentation animale : vers une évolution de la règle des 3R.

RESUME : L'éthique en expérimentation animale est devenue une préoccupation majeure dans notre société actuelle qui prend davantage en compte la souffrance animale. Ces dernières années, de nombreuses lois ont été élaborées en faveur de la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, tant au niveau européen que national, ainsi que pour la mise en œuvre de la règle des 3R selon RUSSELL et BURCH : réduire, raffiner et remplacer. Après avoir passé en revue les différentes méthodes permettant l'application de cette règle des 3R, nous allons étudier ici les méthodes alternatives/substitutives existantes qui permettent maintenant, de faire évoluer cette règle des 3R vers un 4ème voire un 5ème R c'est-à-dire, la réutilisation et la réhabilitation des animaux de laboratoire.

MOTS CLES: expérimentation animale, éthique, méthodes alternatives/substitutives, réhabilitation, réutilisation.

ENGLISH TITLE : Ethics in animal experimentation : towards an evolution of the 3R rule.

ABSTRACT : Ethics in animal experimentation has become a major concern in our current society, which takes animal suffering more into account. In recent years, many laws have been developed in favor of the protection of animals used for scientific purposes, both at European and national level, as well as for the implementation of the 3R rule according to RUSSELL and BURCH: reduce, refine and replace. After having reviewed the different methods allowing the application of this 3R rule, we are going to study here the existing alternative / substitute methods which now allow this 3R rule to evolve towards a 4th or even a 5th R. that is, the reuse and rehabilitation of laboratory animals.

KEYWORDS: animal experimentation, ethics, alternative / substitute methods, rehabilitation, reuse.