



HAL
open science

L'utilisation des animaux dans la recherche pharmaceutique

Amandine Portier

► **To cite this version:**

Amandine Portier. L'utilisation des animaux dans la recherche pharmaceutique. Sciences pharmaceutiques. 2023. dumas-04414077

HAL Id: dumas-04414077

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04414077v1>

Submitted on 24 Jan 2024

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.

IMPORTANT : OBLIGATIONS DE LA PERSONNE CONSULTANT CE DOCUMENT

Conformément au *Code de la propriété intellectuelle*, nous rappelons que le document est destiné à un **usage strictement personnel**. Les "analyses et les courtes citations justifiées par le caractère critique, polémique, pédagogique, scientifique ou d'information" sont autorisées sous réserve de mentionner les noms de l'auteur et de la source (article L. 122-4 du *Code de la propriété intellectuelle*). Toute autre représentation ou reproduction intégrale ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit, est illicite.

De ce fait, nous vous rappelons notamment que, **sauf accord explicite** de l'auteur de la thèse ou du mémoire, **vous n'êtes pas autorisé** à rediffuser ce document sous quelque forme que ce soit (impression papier, transfert par voie électronique, ou autre). Tout contrevenant s'expose aux peines prévues par la loi.

ANNEE 2023

N°
(complété par la scolarité)

THESE
pour le
DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par
Amandine PORTIER

Présentée et soutenue publiquement le 23 octobre 2023

L'utilisation des animaux dans la recherche pharmaceutique

Président : M. Pagniez François, MCU, UFR des Sciences
Pharmaceutiques

Directeur : M. François Lang, PU, UFR des Sciences
Pharmaceutiques

Membres du jury : M. Brochard Fabien, Pharmacien d'officine, St Florent
Le Vieil

Je dédie ces remerciements à toutes celles et ceux qui se reconnaîtront à travers ces lignes...

A ceux qui sont restés à mes côtés malgré tout et m'ont toujours soutenu comme si j'étais leur propre fille

A celui à qui je dois la vie, qui a toujours été là chaque fois que j'avais besoin de lui

A ceux qui m'ont transmis le goût d'apprendre depuis le primaire jusqu'à la faculté, et qui ont toujours eu la patience de répondre à chacune de mes questions malgré mes demandes incessantes

A ceux qui sont devenus comme une famille de cœur pour moi et qui m'apportent bien plus qu'ils ne le croient

A ceux qui embellissent mes journées de travail en partageant sourires et bonne humeur

A ceux que je peux appeler à n'importe quelle heure du jour et de la nuit, pour se faire un apéro ou tout simplement pour discuter au téléphone

A ceux qui me permettent de décompresser chaque week-end où l'on se voit et à qui je dois ma passion des jeux de société, mais surtout une amitié sincère

Et enfin, à celui avec qui je partage ma vie, qui m'a épaulé tout au long de cette aventure et bien plus encore, qui a su me remotiver dans les moments de doute, qui m'a transmis cette curiosité intellectuelle, et sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour.

Si vous vous reconnaissez dans ces lignes, c'est que vous comptez énormément pour moi. Un grand merci à vous tous, car chacun à sa manière, a su m'apporter exactement ce dont j'avais besoin au moment opportun.

Table des matières

I. Histoire de l'expérimentation animale	6
II. Les modèles animaux en recherche pharmaceutique.....	11
1. Le choix du modèle.....	12
2. Quelques chiffres selon l'enquête statistique du ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation	18
a. <i>Espèces animales utilisées</i>	19
b. <i>Provenance des animaux</i>	20
c. <i>Réutilisation des animaux</i>	22
d. <i>Recherche impliquant des primates</i>	23
e. <i>Classes de sévérité des procédures expérimentales</i>	23
f. <i>Statut génétique des animaux</i>	25
g. <i>Objet des utilisations d'animaux</i>	26
h. <i>Production d'origine animale, contrôle qualité et obligations législatives ou réglementaires</i>	27
i. <i>Domaines des obligations législatives ou réglementaires</i>	28
3. Rapport de la Commission Européenne sur la mise en œuvre de la directive 2010/63/UE(19) 29	
a. <i>Évaluation et autorisation des projets</i>	29
b. <i>Animaux élevés, mis à mort mais non utilisés</i>	30
c. <i>Approvisionnement en primates non humains</i>	31
d. <i>Dérogations accordées</i>	32
e. <i>Retraits d'autorisation de projet et d'agrément des éleveurs, fournisseurs et utilisateurs</i>	32
f. <i>Sanctions juridiques</i>	33
4. Modèle de la souris	33
a. <i>Caractéristiques biologiques</i>	33
b. <i>Avantages du modèle</i>	34
c. <i>Présentation des différentes souches et domaines d'application</i>	36
5. Modèle du rat.....	46
a. <i>Caractéristiques biologiques</i>	47
b. <i>Les avantages du modèle</i>	48
c. <i>Présentation des différentes souches et modèles d'application</i>	49
6. Autres modèles	52
a. <i>Le poisson zèbre</i>	52
b. <i>La drosophile</i>	53
c. <i>Les primates non humains</i>	55
III. La recherche médicale.....	58
1. Plusieurs types de recherche	58
a. <i>Recherche fondamentale</i>	58
b. <i>Recherche appliquée</i>	60
2. Etapes de développement d'un médicament	62
a. <i>Phase préclinique</i>	63
b. <i>Phase I</i>	64
c. <i>Phase II</i>	65
d. <i>Phase III</i>	65
e. <i>Phase IV</i>	66
3. L'utilisation des animaux pendant la phase préclinique	67
a. <i>Étude du potentiel cancérigène</i>	68
b. <i>Étude de génotoxicité</i>	70
c. <i>Étude de toxicocinétique</i>	76

d.	Étude de toxicité chronique.....	79
e.	Étude de toxicité aiguë ou à dose unique	80
f.	Étude de toxicité pour la reproduction	81
g.	Études d'innocuité pour les essais cliniques	86
h.	Études d'immunotoxicité.....	90
i.	Sécurité des produits anticancéreux	94
j.	Étude du potentiel phototoxique(77).....	95
IV.	Autres utilisations des animaux en recherche et production pharmaceutique	98
1.	Utilisation des animaux dans la détection de cancers	98
2.	Utilisation des animaux comme une source de médicaments	100
a.	L'histoire de l'insuline.....	100
b.	Production d'anticorps	101
3.	Utilisation du porc en xénotransplantation.....	101
V.	Hébergement et soins des animaux de laboratoire.....	102
1.	Environnement de vie.....	103
a.	Micro et macro-environnement	103
b.	Température et humidité.....	103
c.	Qualité de l'air.....	105
d.	Luminosité	106
e.	Niveau sonore.....	107
2.	Hébergement	108
a.	Dimensions de la cage.....	109
b.	Types de cages(97)	111
3.	Gestion des besoins.....	112
a.	Besoins comportementaux et sociaux	112
b.	Besoins alimentaires	118
4.	Soins vétérinaires	119
a.	Contact humain et manipulation.....	119
b.	Surveillance des animaux.....	120
c.	Chirurgie et anesthésie	121
d.	Gestion de la douleur	123
e.	Euthanasie	125
VI.	Les limites de l'expérimentation animale	130
1.	Transposition.....	130
2.	Coût.....	132
VII.	Les méthodes alternatives à l'expérimentation animale.....	133
1.	Ex vivo	133
2.	In vitro.....	134
3.	In silico	135
VIII.	La retraite des animaux de laboratoire	136
1.	Devenir des animaux	136
2.	Réhabilitation des animaux	137
a.	Démarche de réhabilitation	138
b.	Les refuges partenaires	140
c.	Les laboratoires partenaires	140

IX. Réflexion éthique	141
1. Règle des 3R	141
2. Réflexion personnelle	142
X. Annexes	149
1. Dimensions des cages	149
2. Encadrement légal de l'expérimentation animale	157
a. <i>Législation française et législation européenne</i>	157
b. <i>Champs d'application et définitions (R214-87 à 89)</i>	157
c. <i>Protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (R214-90 à 98)</i>	160
d. <i>Agrément et contrôle des établissements éleveurs, fournisseurs et utilisateurs (R214-99 à 104)</i>	163
e. <i>Procédures expérimentales (R214-105 à 115)</i>	165
f. <i>Autorisation des projets (R214-117 à 126)</i>	169
g. <i>Organismes nationaux (R214-130 à 137)</i>	172
XI. Sources	176

Pourquoi ce sujet ?

Ces dernières décennies, l'animal s'est vu attribué une place au sein de notre société de plus en plus grande, passant du statut juridique d'objet à celui d'être sensible(1). De fait, des travaux scientifiques - réalisés sur des animaux - ont révélé à quel point l'homme pouvait être proche du règne animal, et même plus encore, qu'il en faisait partie. Partant de ce constat, plusieurs courants de pensée ont émergé et ont remis en question notre façon de traiter les animaux.

Entre autres, la question de l'expérimentation animale est devenue un vrai débat d'actualité et c'est de ce sujet que je vais traiter ici. Côté santé et de la recherche - par mon métier -, et celui des animaux - du fait de mes animaux de compagnie et ma passion -, j'ai souvent été confrontée à des avis très opposés concernant l'utilisation des animaux en recherche pharmaceutique. Je me suis moi-même interrogée à ce sujet dans ma volonté de travailler pour la recherche médicale. Ce sujet de thèse s'est donc imposé à moi comme un choix pertinent, personnel, et d'actualité. Il me tient à cœur de faire le point sur cette question, d'en présenter les intérêts et les limites, afin de permettre à chacun de se faire son opinion en connaissance de cause, tout en gardant mon impartialité. Bien qu'il ait été traité de nombreuses fois, ce sujet fait preuve de nombreuses actualisations que nous allons voir.

Cette thèse a donc pour objectif de donner la situation actuelle sur l'utilisation des animaux en recherche pharmaceutique, principalement en France et en Europe, les modèles animaux dont dispose la recherche, et les alternatives réalisables ou non. J'aborderai également la question éthique que pose ce sujet en présentant les grands courants de pensée qu'on peut trouver aujourd'hui. Enfin, un dernier point mais pas des moindres, sera exposé : celle de la retraite des animaux de laboratoire.

I. Histoire de l'expérimentation animale

Les premières traces d'expérimentation menée sur les animaux remontent à l'Antiquité. En ce temps, des philosophes comme Aristote ou bien des médecins comme Galien(2,3), réalisent des dissections d'animaux aussi bien vivants que morts (et sur des cadavres humains également)(4). La vivisection était, à cette époque, un

moyen de connaître le fonctionnement d'un organisme proche du corps humain. Bien que l'animal n'eût pas du tout la même place dans la société, la question soulevait déjà des problèmes éthiques mais de manière minime : Pythagore remettait en doute le sens moral de cette pratique et prônait un plus grand respect des animaux, principalement car il pensait que les âmes humaines pouvaient se réincarner dans un réceptacle animal(3).

On peut donc dire que simultanément à l'expérimentation animale est né un courant antivivisectionniste. Émettons néanmoins quelques réserves : on ne peut pas tout à fait qualifier les vivisections de l'époque d'expérimentation animale au sens où on l'entend actuellement, ni parler de réel courant antivivisectionniste tant ses défenseurs étaient peu nombreux. En effet, la vivisection ne relevait pas d'un processus d'expérimentation moderne : on ne testait pas une hypothèse sur un animal (la méthode scientifique n'était pas encore de mise). On se contentait d'observer, sans préalable réflexion scientifique. Et c'est là toute la différence avec l'expérimentation animale qui est aujourd'hui menée dans un but précis. Certains penseurs de l'époque n'étaient pas contre la vivisection par soucis d'empathie, mais plutôt « par soucis de ne pas choquer ». Le singe, par exemple, était considéré comme physiquement trop proche de l'homme, et il était recommandé de ne pas utiliser cette espèce afin de « ne pas choquer la sensibilité du public »(3). C'est assez paradoxal étant donné que l'on souhaitait justement une espèce proche de l'homme pour comprendre la fonction du corps humain.

L'expérimentation animale est finalement laissée de côté pendant les temps qui suivirent jusqu'à réapparaître de manière ponctuelle pendant la Renaissance. Ce n'est qu'au XIX^{ème} siècle que l'expérimentation animale trouve son heure de gloire, avec François Magendie et celui qui perpétuera son œuvre : Claude Bernard. Ces deux auteurs vont promouvoir la rigueur et la systématisation de l'expérimentation animale. Cette dernière ne servira plus seulement à observer le lien entre fonction et organe, mais visera à répondre à des questions plus complexes. Claude Bernard détaillera dans ses écrits une méthodologie des plus rigoureuses(5). Le scientifique doit observer puis émettre une hypothèse. De cette hypothèse, il va formuler une expérience dont les résultats lui permettront d'affirmer ou d'infirmer son hypothèse de départ : c'est la

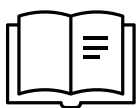
méthode hypothético-déductive. De cette façon, il amène l'expérimentation animale au-delà du simple intérêt anatomique qu'on lui attribuait dans l'Antiquité.

En scientifique éclairé, Claude Bernard va toucher du doigt la notion de « modèle animal » puisqu'il remarque lui-même les différences physiologiques entre animal et humain, et même entre animaux. Il fait remarquer que « *l'étude expérimentale de ces diversités peut selon nous donner l'explication des différences individuelles que l'on observe chez l'homme* ». Depuis cette période, Claude Bernard ainsi que d'autres scientifiques, ont inculqué plus de rigueur dans la science : c'est un véritable courant de pensée scientifique qui s'inscrit dans une démarche hypothético-déductive rigoureuse.

Avec l'avènement de l'expérimentation animale au XIX^{ème} siècle, se pose dans le même temps un souci grandissant du bien-être animal. Claude Bernard tendait à rejeter toute philosophie dans sa pratique de la science, et écartait par là-même la notion de réflexion éthique : « Je n'admets donc pas la philosophie qui voudrait assigner des bornes à la science, pas plus que la science qui prétendrait supprimer les vérités philosophiques qui sont actuellement hors de son propre domaine »(5). La recherche de vérité, la vérité scientifique, ne devait souffrir d'aucune limitation philosophique selon lui, considérant que la philosophie et la science relevait de deux disciplines bien distinctes. Il considérait d'ailleurs ses modèles d'expérimentation comme des « machines-vivantes » et était parfaitement insensible à leur douleur. Selon lui, l'intérêt humain surplombait celui de l'animal, et ne nécessitait aucune remise en question à ce sujet. A une époque où la consommation de produits animaliers paraissait des plus évidentes, le sacrifice de quelques animaux pour la science était parfaitement justifié, quelles qu'en soient les conditions. Dans ses écrits, Claude Bernard évoque de manière très succincte (et parfois contradictoire) l'aspect éthique de l'expérimentation animale. D'une part, il considère que réaliser des expériences sur des êtres humains est un devoir et donc un droit si cela a pour but de leur sauver la vie ou de les guérir – pour autant, il supporte les expérimentations faites sur des condamnés à mort tant qu'elles n'impliquent aucune souffrance, même si elles n'ont pas d'intérêt pour le malade lui-même(5). D'autre part, pour répondre à la

question de l'éthique de l'expérimentation animale, je me permettrais de citer ce passage de Claude Bernard qui résume sa pensée :

« 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. Il serait bien étrange, en effet, qu'on reconnût que l'homme a le droit de se servir des animaux pour tous les usages de la vie, pour ses services domestiques, pour son alimentation, et qu'on lui défendît de s'en servir pour s'instruire dans une des sciences les plus utiles à l'humanité. Il n'y a pas à hésiter ; la science de la vie ne peut se constituer que par des expériences, et l'on ne peut sauver de la mort des êtres vivants qu'après en avoir sacrifié d'autres. Il faut faire les expériences sur les hommes ou sur les animaux. Or, je trouve que les médecins font déjà trop d'expériences dangereuses sur les hommes avant de les avoir étudiées soigneusement sur les animaux. Je n'admets pas qu'il soit moral d'essayer sur les malades dans les hôpitaux des remèdes plus ou moins dangereux ou actifs, sans qu'on les ait préalablement expérimentés sur des chiens ; car je prouverai plus loin que tout ce que l'on obtient chez les animaux peut parfaitement être concluant pour l'homme quand on sait bien expérimenter. Donc, s'il est immoral de faire sur un homme une expérience dès qu'elle est dangereuse pour lui, quoique le résultat puisse être utile aux autres, il est essentiellement moral de faire sur un animal des expériences, quoique douloureuses et dangereuses pour lui, dès qu'elles peuvent être utiles pour l'homme. »(5)



**A lire : Introduction à l'étude de la médecine expérimentale -
Claude Bernard**

Mais avec la diffusion des expériences, sont montées des voix contre l'expérimentation animale, jugeant cruel de faire souffrir un animal au nom du bien commun. La femme et les filles de Claude Bernard ont été si choquées par les expériences qu'il avait menées, qu'elles ont construit un cimetière pour chien avec une partie de son héritage(3,4). C'est au XXème siècle que s'opère un changement de mentalité chez une partie des Européens, car l'animal n'est alors plus seulement vu comme un moyen de s'alimenter, mais comme un animal doué de sensibilité. Les chiens ne sont plus choisis pour une fonction précise dans la famille (garde de la

maison, gardien de troupeau, etc.) mais pour leur affection partagée avec leurs maîtres. Les chevaux ne représentent plus seulement un moyen de transport, mais un compagnon avec qui se développe une relation de complicité. La société prend conscience, petit à petit, que ces animaux que nous avons pensés si différents de nous, peuvent parfois nous surprendre tant ils expriment des sentiments et émotions similaires aux nôtres : joie, souffrance, anxiété, peur. Se développe même un certain anthropomorphisme : nous attribuons des comportements humains aux animaux sans véritable fondement. Nous les comparons tellement à nous autres, humains, qu'on finit par penser qu'ils agissent comme nous, et oublions leurs instincts primaires. Cette façon de penser, qui relève en partie de l'émotionnel, de la proximité nouvelle des animaux avec l'être humain, conduit finalement à remettre en question tout un système d'exploitation des animaux : la consommation de viande, de produits animaliers, et bien évidemment l'utilisation des animaux en recherche(6). C'est dans ce contexte que vont se développer des lois encadrant l'expérimentation animale. Sous la pression des défenseurs des animaux, les États, notamment Européens, souhaitent légiférer l'utilisation des animaux dans la recherche médicale.

En 1985, le Conseil de l'Europe crée une Convention STE 123, base de la législation sur l'expérimentation animale. La première directive traduisant cette Convention est adoptée en 1986 (directive 86/709)(7). Il s'agit donc des premières lois visant à encadrer l'expérimentation animale et montrant une volonté des politiques à reconnaître l'animal comme un être sensible. Sans pour autant oublier tout l'intérêt de ces expérimentations, cette directive a pour objectif de réduire au strict nécessaire le nombre d'animaux utilisés. A cette fin, elle établit des règles relatives à l'hébergement et aux soins des animaux, l'utilisation d'anesthésiques pour limiter la souffrance de ceux-ci, l'utilisation de méthodes alternatives lorsque c'est possible. Le zoologiste William Russell et le microbiologiste Rex Burch ont fortement contribué à cette réglementation en définissant le principe des « 3R » : remplacement, réduction, raffinement. Nous parlerons plus en détail de ce principe dans la partie Législation.

Cette directive a été révisée en 2010 pour être mise à jour et approfondie en fonction des nouvelles connaissances sur le sujet. Aujourd'hui, c'est ce même texte qui a été transposé dans la loi française et qui régit l'expérimentation animale.

La notion de « modèle animal », quant à elle, est une notion relativement récente. Claude Bernard commence tout juste à la définir puisqu'il est parfaitement conscient que chaque animal est différent et est également différent de l'homme. En réalité, le terme « modèle animal » sous-entend qu'il y a un choix à faire dans l'espèce choisie pour une expérimentation donnée. Certains animaux sont plus appropriés selon le but de l'expérience : drosophile pour l'étude de la génétique, primates pour l'étude des maladies neurologiques, etc.

De nombreux travaux de recherche sont en cours afin de trouver des solutions alternatives à l'expérimentation animale. Certaines sont déjà pratiquées depuis longtemps, comme la culture *in vitro*, mais elle ne peut se substituer totalement à l'expérimentation animale. D'autres sont en cours de développement, comme des logiciels de simulation de l'organisme humain, ou la reconstitution d'organes humains. Chacune apporte ses bénéfices mais malheureusement, à l'heure actuelle, les chercheurs les jugent toujours insuffisantes à reproduire entièrement le vivant(8). Nous les détaillerons de manière plus approfondie plus tard.

II. Les modèles animaux en recherche pharmaceutique

On entend régulièrement parler de « modèle animal » ou même d'« organisme modèle » en recherche médicale, ou encore « d'animal expérimental ». Afin de partir sur une même base précise, l'*American National Council Committee on Animal Models for Research and Aging* a défini ce terme de modèle animal comme étant : « un modèle permettant l'étude de données de référence sur la biologie ou le comportement, ou chez lequel on peut étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales ». C'est sur cette définition que nous allons nous baser pour la suite. Comme on peut le lire dans cette définition, le modèle animal est principalement décrit par son utilité (« qui permet l'étude de données ») mais aussi par sa proximité avec l'humain (« ayant un ou plusieurs aspects communs », véritable cible de ce savoir.

1. Le choix du modèle

Après avoir correctement défini le modèle animal, nous allons voir comment, en pratique, le choix se porte vers telle ou telle espèce en particulier. Quelles sont les caractéristiques à prendre en compte pour choisir un bon modèle animal pour son expérimentation ? Qu'est-ce qu'un bon modèle animal exactement ?

C'est seulement après avoir pris en compte tous ces éléments que le chercheur va se diriger vers un modèle animal plutôt qu'un autre. Il faut savoir également qu'il n'y a jamais qu'une seule étude à l'origine d'une grande découverte médicale : plusieurs études, la plupart du temps sur plusieurs modèles animaux, sont nécessaires pour comprendre comment fonctionne un phénomène biologique. Ce sont le regroupement et l'analyse de nombreuses données qui permettent de transposer les résultats à l'homme. Ainsi, le chercheur doit trouver le modèle le plus pertinent pour son étude, au risque que les résultats obtenus ne soient pas suffisamment transposables.

Classification des modèles animaux :

Les modèles peuvent être classés de la façon suivante(9) :

- Modèles sains : ils ne présentent pas de pathologie, ils servent généralement à reproduire un organisme non malade (pour l'étude de la toxicité d'un médicament par exemple)
 - o Modèles non consanguins
 - o Modèles consanguins : croisement entre frère et sœur sur au moins 20 générations consécutives, afin d'avoir un modèle génétiquement homogène
 - o Modèles hybrides F1 : première génération de croisement
- Modèles pathologiques :
 - o Modèles spontanés ou naturels : ce sont des animaux qui présentent naturellement une certaine pathologie et dont la lignée a été entretenue. C'est le cas par exemple de la souris NOD qui présente naturellement une insulite (c'est-à-dire que la souris présente

spontanément une destruction auto-immune des îlots de Langerhans de son pancréas), ce qui en fait un bon modèle pour le diabète de type 1.

- Modèles induits ou expérimentaux : ce sont des modèles animaux qui sont sains au départ, mais chez lesquels on a provoqué une maladie, par le biais de substances chimiques (la streptozotocine est utilisée pour provoquer le diabète en détruisant les cellules β -pancréatiques), d'agents physiques (des radiations pour provoquer un cancer), par chirurgie, ou encore par manipulation génétique.
 - Les modèles génétiquement modifiés font partie des modèles induits. Ce sont des animaux dont on a modifié la génétique pour qu'ils développent une maladie : on insère un codon stop dans la séquence d'un gène pour que l'animal ne produise plus la protéine correspondante (ce sont les modèles Knock-Out) ou bien on insère un gène à la place d'un autre (modèles Knock-In).
- Modèles négatifs : ce sont des animaux naturellement résistants à certaines pathologies. Par exemple, le lapin ne contracte pas d'infection à gonocoque. Etudier les raisons pour lesquelles il est insensible à cette pathologie peut permettre d'en apprendre plus sur celle-ci ou bien de trouver un traitement.
- Modèles orphelins : ce sont des animaux chez lesquels des pathologies se développent naturellement mais qui n'ont pas d'équivalent chez l'homme. C'est le cas de la tremblante du mouton, bien qu'aujourd'hui elle entre dans la catégorie des encéphalopathie spongiformes dont on retrouve un équivalent chez l'homme (avec par exemple la maladie de Creutzfeld-Jakob).

Le choix du modèle animal dépend en premier lieu du but recherché : s'agit-il de recherche sur un mécanisme physiologique ? sur une pathologie bien particulière ? s'agit-il de tester l'efficacité d'un traitement ? Ou d'en tester l'innocuité ? Selon les besoins de l'étude, le chercheur s'orientera vers un modèle sain ou un modèle pathologique. Puis il choisira l'espèce animale la plus adéquate : pour tester une technique de chirurgie par exemple, mieux vaut partir sur une espèce animale plus

grosse que la souris (trop petite et difficilement opérable). Le chercheur devra prendre en compte des contraintes économiques : même s'il s'avère que le cochon est plus adapté, l'entretien de plusieurs individus peut être coûteux (ce qui limiterait le nombre d'individus, rendant l'étude peut-être moins fiable).

Le choix se fera parmi une multitude de modèles disponibles pour la recherche, mais quel que soit l'animal choisi, le chercheur devra être vigilant aux facteurs pouvant influencer la réponse du modèle animal. En effet, beaucoup d'éléments peuvent influencer les résultats de l'étude, même si le modèle choisi est le plus adéquat. Ces éléments sont à prendre en considération pour le choix de l'espèce.

Facteurs influençant la réponse du modèle animal :

Même en choisissant le modèle animal le plus approprié, d'autres paramètres peuvent influencer la réponse de l'animal dans une expérience, et donc peuvent influencer les résultats obtenus. Ces facteurs peuvent être :

- Des facteurs liés à l'animal lui-même(10) : comme son âge, son sexe, son rythme biologique, sa flore microbienne, sa génétique, son comportement, etc.
 - o Son âge ou son sexe : les jeunes animaux n'ont pas tout à fait le même métabolisme que les adultes, de même qu'il existe des différences de métabolisation entre la femelle et le mâle.
 - o Sa génétique : si on choisit de prendre des modèles consanguins, tous les individus auront le même patrimoine génétique. Attention cependant, car pour une même lignée, il peut exister quelques petites différences selon leur provenance et leur fournisseur. De plus, les modèles consanguins sont généralement plus fragiles que les modèles sauvages.
 - o Sa flore microbienne : c'est un élément qui peut paraître anodin mais il est désormais bien établi que la flore d'un animal influence par exemple le métabolisme de certains médicaments et la réponse immunitaire contre un pathogène. De fait, certains fournisseurs produisent des animaux axéniques, c'est-à-dire exempts de tous germes saprophytes ou pathogènes, et donc dépourvus de microbiote (ce qui requiert des conditions d'élevage très rigoureuses). Ces animaux ont notamment

servi à démontrer l'influence du microbiote sur le fonctionnement du tube digestif(11), sur le système immunitaire intestinal(12), et sur la régulation du fer(13). Il est également possible d'obtenir des animaux dits gnotobiotiques en exposant une souche axénique à une ou plusieurs bactéries d'intérêt. Récemment, la transplantation fécale (afin de restaurer un nouveau microbiote chez le patient) a montré ses preuves dans la résolution d'infections récidivantes à *Clostridium difficile* chez l'homme(14).

- Son rythme biologique : le moment d'administration d'un médicament peut avoir des conséquences sur ses effets ou son métabolisme. Par exemple, le rat est un animal nocturne donc, contrairement à nous, son métabolisme augmente la nuit.
 - Diverses pathologies : il est évident qu'une maladie présente chez l'animal va modifier les résultats de l'étude. En revanche, certaines maladies ne sont parfois pas ou peu visible chez l'animal, c'est ce qu'on appelle des maladies subcliniques : l'animal paraît en bonne santé mais il est pourtant infecté par des pathogènes ou présente une pathologie silencieuse. C'est le cas par exemple de l'infection à parvovirus chez la souris. Cette infection virale modifie la réponse des lymphocytes T en infectant les tissus lymphoïdes. Ainsi, si l'objet de l'étude concerne le système immunitaire de la souris, les résultats seront impactés. Pour cette raison, les fournisseurs d'animaux de laboratoire présentent des certificats sanitaires. En Europe, seuls les standards SPF (Specific Pathogen Free) et SOPF (Specific and Opportunist Pathogen Free) sont reconnus et attestent de la bonne santé des animaux. Les standards SPF et SOPF correspondent à une liste d'exclusion des principaux pathogènes (principaux agents zoonotiques pour le SPF, auxquels on ajoute les principaux pathogènes opportunistes pour le SOPF)(15).
- Des facteurs environnementaux :
- La température de la pièce : ce paramètre est d'autant plus important que l'on travaille sur des petits animaux sensibles aux variations de températures. Les animaux vont ainsi adapter leur métabolisme à la température (par exemple en se nourrissant d'avantage si la température

est peu élevée). Les variations de température devraient être limitées à 2°C.

- Le taux d'humidité : en général, les animaux utilisés en laboratoire tolèrent mieux une humidité relative entre 40 et 60%. Au-delà, il y aura une incidence sur leur thermorégulation, leur consommation alimentaire, et sur leur sensibilité aux maladies. Par exemple, une humidité prolongée peut provoquer des nécroses de la queue chez le jeune rat.
- La ventilation : comme pour nous, une ventilation adaptée est nécessaire à la fois au niveau de la pièce mais également au niveau des cages car l'air ambiant peut y être différent. Les cages à micro-isolation statique sont utilisées pour isoler la cage des différents microorganismes (un peu comme une boîte de pétri pour animaux). Mais ces cages peuvent induire des taux élevés d'ammoniac et de dioxyde de carbone au niveau de la cage elle-même, et nécessitent donc une ventilation spécifique pour réguler ces taux. Les concentrations peuvent également différer d'un endroit à l'autre de la pièce. Pour limiter ces biais, on peut placer les animaux de façon aléatoire dans la pièce.
- L'éclairage : une luminosité et un rythme d'éclairage proche des conditions naturelles limite l'impact sur l'étude en cours. Il est non seulement important de respecter le cycle jour/nuit, mais également de ne pas avoir de variations brutales de luminosité. Idéalement, il faut utiliser un système simulant les différentes phases d'intensité lumineuse dans la nature (aube et crépuscule) et reproduire ces variations de luminosité au niveau de l'environnement des animaux. Une luminosité trop forte peut induire des lésions de la rétine. La longueur d'onde a une incidence sur la durée du cycle oestrien des femelles(10). De faibles instants de lumière pendant la phase de nuit peut aussi avoir des répercussions sur l'étude en cours : cela peut favoriser la prolifération de cellules tumorales à cause d'une perturbation de la sécrétion de mélatonine(16).
- Le bruit : les rongeurs y sont particulièrement sensibles et on sait que des bruits soudains et forts peuvent causer des comportements

d'anxiété, mais pas uniquement. De forts bruits peuvent déclencher des crises de convulsions, particulièrement chez les jeunes individus. Les rongeurs sont notamment sensibles aux ultrasons, contrairement à nous.

- Alimentation et eau : l'alimentation doit être adaptée pour couvrir les besoins nutritionnels de l'espèce, idéalement sans résidu chimique qui pourraient fausser les résultats de l'étude. Il en va de même pour l'eau qui doit être de consommation humaine. Pour autant, selon la zone géographique ou encore la saison, la qualité de l'eau peut varier. La plupart des animaleries utilisent aujourd'hui des systèmes de filtration par osmose inversée afin de régulariser la qualité de l'eau.
- Des facteurs liés à la manipulation et aux soins :
 - Transport : un temps d'adaptation est nécessaire après l'arrivée des animaux au laboratoire afin qu'ils se fassent à leur nouvel environnement et retrouve leurs habitudes alimentaires.
 - Hébergement : comme pour toute espèce animale, la taille de l'espace disponible pour chacun des animaux est primordiale car cela joue sur le stress des animaux et donc sur leur comportement (et sur leur métabolisme). Le nombre d'animaux par cage ne doit pas varier au cours de l'étude. Il faut que les animaux soient dans un groupe suffisamment grand pour permettre des interactions sociales mais pas au point de générer du stress et des conflits. L'hébergement individuel n'est pas recommandé, sauf besoin particulier pour l'étude.

Mettre à disposition des enrichissements du milieu permet d'améliorer la qualité de vie de l'animal et d'exprimer des comportements naturels. Toutefois, ces enrichissements doivent être identiques pour tous les animaux de l'étude, et doivent être constants.
 - Soins courants : la manipulation des animaux au quotidien (pour les différents besoins de l'étude et pour le suivi des animaux) devrait être faite de façon uniforme dans la mesure du possible, afin qu'il y ait le moins de différences de manipulation et de stress généré entre chaque animal. Le moment et la durée de manipulation devrait être identique pour chaque animal. Il est préférable que ce soit toujours le même personnel qui manipule, en douceur, les animaux pour réduire leur

stress. Si ce n'est pas possible, privilégier des manipulations de façon aléatoire pour réduire ce biais. Chaque manipulation peut être source d'anxiété pour l'animal, par conséquent, les prélèvements ou autres observations ne devraient pas être faits directement après, ni après le nettoyage de leur cage par exemple. Une étude réalisée en 1987 sur des porcs a montré que le taux de fécondité était différent selon que les femelles subissaient des manipulations agréables ou désagréables, en lien avec leur niveau de cortisol(17). Cela suggère un fort intérêt pour habituer les animaux à ces manipulations courantes, en les récompensant avec des friandises par exemple, afin d'améliorer leur coopération, mais surtout leur bien-être.

- o Douleur : la prise en charge de la douleur est un aspect important lors des études, à la fois pour éviter les perturbations physiologiques (la douleur influence de nombreux mécanismes et peut perturber les résultats de l'étude) et pour le bien-être animal. Cette prise en charge passe par l'utilisation d'analgésique, par une manipulation en douceur de l'animal, par la limitation du stress engendré. De manière exceptionnelle, la douleur peut ne pas être prise en charge lorsque cela est scientifiquement justifié par le but de l'étude (étude sur le niveau de douleur ressenti, étude sur un antalgique, etc.).

Pour limiter au maximum l'influence de ces facteurs, il est parfois nécessaire – selon l'objectif de l'étude – d'avoir des souches standardisées (d'où l'intérêt d'avoir des élevages agréés qui connaissent et garantissent la génétique d'une souris), et de contrôler régulièrement ces paramètres pour qu'ils soient optimisés. La manipulation des animaux nécessite un personnel qualifié et attentif à leur bien-être.

2. Quelques chiffres selon l'enquête statistique du ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation

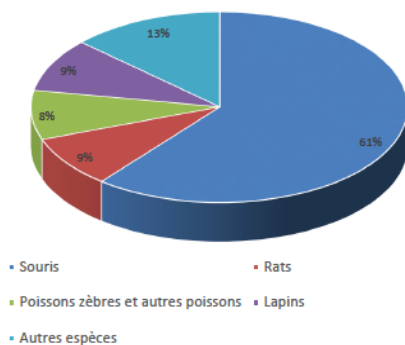
Le ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation réalise tous les ans une enquête statistique sur l'utilisation des animaux à des fins scientifiques au sein des établissements français (privé et publics). Je vous présente ici l'étude la plus récente, relatant les chiffres de 2021.

Il faut savoir que cette étude n'a pris en compte que les animaux vertébrés et les céphalopodes (ne sont pas comptabilisés les invertébrés comme la mouche drosophile ou le ver nématode qui pourtant sont d'importants modèles). De la même façon, ne sont pas pris en compte « les animaux élevés dans les établissements pour générer des animaux expérimentaux, y compris des animaux génétiquement altérés mais sans phénotype dommageable » et « les animaux euthanasiés, selon des méthodes réglementaires, pour prélèvement d'organes ou de tissus ». Si un animal est réutilisé dans plusieurs expérimentation (selon le principe des 3R), alors il est comptabilisé le nombre de fois où il est utilisé.

a. Espèces animales utilisées

L'enquête montre qu'en France, la souris reste l'animal le plus utilisé en expérimentation, et de loin, puisqu'elle représente 60,7% des animaux utilisés, soit 1 150 190 utilisations de souris au total sur 2021. Le second animal le plus fréquemment utilisé est le lapin. Contrairement à ce qu'on pourrait penser, le rat n'arrive qu'en 3^{ème}

1 - Espèces ou types d'animaux



La souris est l'animal le plus fréquemment utilisé (61 % des utilisations). Viennent ensuite les lapins (9,1 %) et les rats (8,7 % des utilisations) puis les poissons (10,5 %, toutes espèces confondues). Toutes les autres espèces d'animaux prises séparément ne représentent au plus que 4,1 % des utilisations. Les primates représentent 0,19 % des utilisations, les chiens 0,23 % et les chats 0,05 %. Le hamster, le cobaye et le furet sont des modèles qui ont intégré des projets de recherche visant notamment à étudier la Covid-19.

Espèces	Total	%
Souris (<i>Mus musculus</i>)	1 150 190	60,7
Lapins (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	172 221	9,1
Rats (<i>Rattus norvegicus</i>)	165 043	8,7
Poules, coqs et poulets (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	77 598	4,1
Poissons zèbres (<i>Danio rerio</i>)	67 405	3,6
Autres poissons	64 428	3,4
Cochons d'Inde (<i>Cavia porcellus</i>)	50 322	2,7
Saumon, truite, ombles et ombres (<i>Salmonidae</i>)	50 187	2,6
Poissons (spp. from families e.g. <i>Serranidae</i> , <i>Moronidae</i>)	16 912	0,9
Porcs (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	15 034	0,8
Dindons (<i>Meleagris gallopavo</i>)	13 864	0,7
Hamsters dorés (<i>Mesocricetus auratus</i>)	12 224	0,6
Autres oiseaux	10 191	0,5
Moutons (<i>Ovis aries</i>)	4 587	0,2
Chiens (<i>Canis familiaris</i>)	4 383	0,2
Xénopes (<i>Xenopus laevis</i> and <i>Xenopus tropicalis</i>)	3 824	0,2
Macaque cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>)	3 276	0,2
Bovins (<i>Bos primigenius</i>)	1 906	0,1
Autres amphibiens	1 866	0,1
Autres rongeurs (other <i>Rodentia</i>)	1 505	0,1
Autres carnivores	1 428	0,1
Céphalopodes	1 134	0,1
Chats (<i>Felis catus</i>)	1 018	0,1
Reptiles	839	
Chevaux, ânes et croisements (<i>Equidae</i>)	668	
Chèvres (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	579	
Gerbilles de Mongolie (<i>Meriones unguiculatus</i>)	423	
Furets (<i>Mustela putorius furo</i>)	251	
Autres mammifères	218	
Marmosets et tamarins	97	
Macaques rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	76	
Prosimiens	60	
Hamsters de Chine (<i>Cricetulus griseus</i>)	56	
Babouins (<i>Papio spp.</i>)	40	
Saimiri (eg. <i>Saimiri sciureus</i>)	30	
Autres espèces de singes de l'ancien monde	11	
Singes vervets (<i>pygerythrus or sabaeus</i>)	3	
Total général	1 893 897	

Figure 1 Espèces ou types d'animaux utilisés à des fins scientifiques - Enquête statistique 2021 sur l'Utilisation d'animaux à des fins scientifiques dans les établissements français - Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

position, puis viennent les poissons. Si on cumule les différentes espèces de poisson (Zebrafish, saumon, etc.), le poisson est le second animal le plus utilisé.

Même si le chiffre reste important, on remarque que certains modèles sont bien moins privilégiés que les autres : c'est le cas des chiens, chats, chevaux, porcs, primates non humains, grenouilles, etc.

Le nombre total d'utilisations d'animaux est supérieur aux années 2020 et 2019, probablement à cause de la crise du Covid-19.

A titre de comparaison, le tableau ci-dessous récapitule les chiffres des années précédentes :

	2020	2019	2018	2017
<i>Total utilisé</i>	1 643 787	1 865 403	1 910 519	1 914 174
<i>Souris</i>	1 048 864 (63,8%)	1 131 723 (61%)	1 192 548 (62%)	1 134 517 (59%)
<i>Poissons (toute espèce confondue)</i>	120 111 (7,3%)	228 296 (12,2%)	256 887 (13,4%)	289 953 (15,1%)
<i>Lapins</i>	144 190 (8,8%)	135 608 (7%)	131 587 (7%)	127 204 (7%)
<i>Rats</i>	149 068 (9,1%)	166 245 (9%)	159 786 (8%)	183 714 (10%)

Figure 2 Nombre d'utilisations d'animaux dans des procédures expérimentales en France de 2017 à 2020

b. Provenance des animaux

L'enquête se poursuit sur la provenance des animaux utilisés en recherche. La loi stipule que les animaux doivent provenir d'élevage agréés spécifiquement pour l'expérimentation (conditions spécifiques d'hygiène, de standardisation, etc.), sauf justification scientifiquement étayée.

D'après les chiffres exposés de 2021, l'immense majorité (87 %) des animaux utilisés en France proviennent d'élevages agréés de l'Union Européenne. Cependant, certains animaux ne proviennent pas d'élevages agréés (10%) : il s'agirait, selon l'étude, d'animaux issus d'établissements utilisateurs, de fournisseurs occasionnels (ferme d'élevage pour les animaux d'intérêt agronomique, ou de parcs zoologiques), en

conformité avec les articles 9 et 10 de la directive 2010/63/UE (aucun animal capturé dans la nature ne peut être utilisé à des fins scientifiques, sauf dérogation exceptionnelle scientifiquement justifiée). Il s'agit principalement d'animaux de rente, car il n'y a pas de fournisseur agréé pour ce type d'animaux (trop peu utilisés en recherche pour cela).

1% des animaux utilisés ne proviennent pas d'Europe car il s'agit de souches bien spécifiques seulement produites à l'étranger (certaines souches de souris transgéniques par exemple).

Concernant les primates utilisés en 2021, la plupart sont nés en Afrique (64%) ou en Asie (25%). Très peu proviennent de l'Union Européenne.

Primate	Primates nés dans l'Union européenne dans un élevage agréé	Primates nés en Asie	Primates nés en Amérique	Primates nés en Afrique
Macaque cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>)	30	699		1826
Marmousets et tamarins (eg. <i>Callithrix jacchus</i>)	89			
Macaques rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	36	8	21	
Prosimiens (<i>Prosimia</i>)	59			
Babouins (<i>Papio spp.</i>)	38			
Saimiri (eg. <i>Saimiri sciureus</i>)	10			
Autres espèces de singes de l'ancien monde				
Singes vervets (<i>pygerythrus or sabaeus</i>)			3	
Total général	262	707	24	1826

Figure 3 Lieu de naissance des primates - Enquête statistique 2021 sur l'Utilisation des animaux utilisés à des fins scientifiques - Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Espèces	Animaux nés dans l'Union européenne dans un élevage agréé	Animaux nés dans l'Union européenne hors élevage agréé	Animaux nés dans le reste de l'Europe	Animaux nés dans le reste du monde
Souris (<i>Mus musculus</i>)	1 039 830	88 525	800	10 058
Lapins (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	167 805	2 022	16	697
Rats (<i>Rattus norvegicus</i>)	157 398	4 120		572
Poissons zèbres (<i>Danio rerio</i>)	63 517	3 247		
Poules, coqs et poulets (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	41 873	35 651		74
Cochons d'Inde (<i>Cavia porcellus</i>)	39 321	10 526		
Autres poissons	30 954	11 826	9 412	12 093
Saumon, truite, ombles et ombres (<i>Salmonidae</i>)	20 574	7 874	21 409	240
Dindons (<i>Meleagris gallopavo</i>)	11 781	2 083		
Hamsters dorés (<i>Mesocricetus auratus</i>)	11 726	44		14
Poissons (spp. from families e.g. <i>Serranidae</i> , <i>Moronidae</i>)	8 525	7 532		855
Porcs (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	7 883	6 935		
Autres oiseaux	6 069	1 642	151	2 323
Moutons (<i>Ovis aries</i>)	2 636	1 568		
Chiens (<i>Canis familiaris</i>)	1 730	62	212	603
Xénopes (<i>Xenopus laevis</i> and <i>Xenopus tropicalis</i>)	1 469	605	15	
Autres amphibiens	966	744	110	46
Autres rongeurs (other <i>Rodentia</i>)	662	106		709
Céphalopodes	432	670		
Chats (<i>Felis catus</i>)	381			58
Chèvres (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	330	58		
Gerbilles de Mongolie (<i>Meriones unguiculatus</i>)	278	145		
Bovins (<i>Bos primigenius</i>)	246	1 062		
Furets (<i>Mustela putorius furo</i>)	233			10
Chevaux, ânes et croisements (<i>Equidae</i>)	70	69		
Reptiles	68	441	2	23
Autres mammifères	62	132		
Hamsters de Chine (<i>Cricetulus griseus</i>)	56			
Autres carnivores	9	21		1 398
Total général	1 616 884	187 710	32 127	29 773
% par rapport au nombre total d'utilisations	85,4	9,9	1,7	1,6

Figure 4 Lieu de naissance des animaux hors primates - Enquête statistique 2021 sur l'Utilisation des Animaux utilisés à des fins scientifiques - Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

c. Réutilisation des animaux

Selon le principe des 3Rs, les animaux peuvent être réutilisés dans un protocole expérimental si le précédent protocole était classé en léger ou modéré (en termes de douleurs et de stress). Cette réutilisation est autorisée dans le but de réduire le nombre total d'animaux utilisés lors d'expérimentation.

L'enquête montre qu'en 2021, 100% des « autres espèces de singes de l'Ancien Monde » (espèces autres que le babouin et le macaque) sont réutilisés, mais ce n'est pas le cas de tous les primates (66% de réutilisations pour les saïmiris, 22% pour les macaques rhesus, 8% pour les marmosets et tamarins, 5% pour les babouins pour ne citer qu'eux).

Les souris, elles, sont réutilisées à hauteur de 1%, probablement à cause de leur faible longévité et parce qu'elles sont généralement euthanasiées en fin de protocole.

On peut remarquer que les réutilisations concernent principalement de grandes espèces (chevaux, certains singes, chats, chiens, etc.).

Espèces	Nombre d'animaux réutilisés	% de réutilisation pour chaque espèce
Autres espèces de singes de l'ancien monde	11	100,0
Chevaux, ânes et croisements (Equidae)	529	79,2
Saimiri (eg. Saimiri sciureus)	20	66,7
Chats (Felis catus)	579	56,9
Xénopes (Xenopus laevis and Xenopus tropicalis)	1 735	45,4
Chiens (Canis familiaris)	1 776	40,5
Reptiles	305	36,4
Chèvres (Capra aegagrus hircus)	191	33,0
Bovins (Bos primigenius)	598	31,4
Macaque cynomolgus (Macaca fascicularis)	721	22,0
Macaques rhesus (Macaca mulatta)	11	14,5
Autres mammifères	24	11,0
Moutons (Ovis aries)	383	8,3
Marmosets et tamarins	8	8,2
Babouins (Papio spp.)	2	5,0
Hamsters dorés (Mesocricetus auratus)	440	3,6
Furets (Mustela putorius furo)	8	3,2
Céphalopodes	32	2,8
Autres rongeurs (other Rodentia)	28	1,9
Rats (Rattus norvegicus)	2 953	1,8
Prosimiens	1	1,7
Porcs (Sus scrofa domesticus)	216	1,4
Lapins (Dryctolagus cuniculus)	1 681	1,0
Souris (Mus musculus)	10 977	1,0
Poissons zèbres (Danio rerio)	641	1,0
Cochons d'Inde (Cavia porcellus)	475	0,9
Saumon, truite, ombles et ombres (Salmonidae)	90	0,2
Autres poissons	143	0,2
Autres oiseaux	6	

Figure 5 Réutilisations - Enquête statistique 2021 sur l'Utilisation des animaux à des fins scientifiques - Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

d. Recherche impliquant des primates

Les primates non humains utilisés en recherche pharmaceutique ne peuvent provenir que d'élevages agréés mais ils ne sont jamais issus du milieu sauvage. Des études peuvent être menées sur des animaux sauvages, mais seulement dans un but éthologique d'observation par exemple, et non pour mener des expériences invasives liées au médicament.

Le tableau précise si le primate est issu d'une première génération d'élevage ou d'une seconde génération (voire plus). Le primate le plus utilisé est le Macaque cynomolgus (qui a particulièrement été utilisé dans les recherches sur la Covid-19), suivi par les marmosets et tamarins, puis le macaque rhesus. Les grands primates (chimpanzé, bonobo, orang-outang) ne sont jamais utilisés dans des procédures expérimentales, du fait de leur plus grande proximité avec l'homme.

Les primates sont réutilisés à hauteur de 21,5%, ici aussi pour éviter d'intégrer de nouveaux individus dans les protocoles.

Primate	Total	Réutilisation	F1	F2 ou plus	Primate	Colonie autonome
Macaque cynomolgus (Macaca fascicularis)	3 276	721	639	1 916	Macaque cynomolgus (Macaca fascicularis)	791
Marmosets et tamarins (eg. Callithrix jacchus)	97	8		89	Marmosets et tamarins (eg. Callithrix jacchus)	31
Macaques rhesus (Macaca mulatta)	76	11	20	45	Macaques rhesus (Macaca mulatta)	29
Prosimiens (Prosimia)	60	1	6	53	Prosimiens (Prosimia)	59
Babouins (Papio spp.)	40	2	9	29	Babouins (Papio spp.)	38
Saimiri (eg. Saimiri sciureus)	30	20		10	Saimiri (eg. Saimiri sciureus)	10
Autres espèces de singes de l'ancien monde	11	11			Autres espèces de singes de l'ancien monde	
Singes vervets (pygerythrus or sabaeus)	3		1	2	Singes vervets (pygerythrus or sabaeus)	3
Total général	3 593	774	675	2 144	Total général	961

Figure 6 Recherches impliquant des primates - Enquête Statistique 2021 sur l'Utilisation des Animaux à des fins scientifiques - Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

e. Classes de sévérité des procédures expérimentales

Les protocoles expérimentaux incluant des animaux sont divisés en plusieurs classes définies par la loi(18) :

- Classe légère : « 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 »

- Classe modérée : « 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 »
- Classe sévère : « 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 »
- Classe sans réveil : « procédures expérimentales menées intégralement sous anesthésie générale, au terme desquelles l'animal ne reprend pas conscience »

Les comités éthiques en expérimentation animale sont en charge de l'évaluation de tout projet de recherche. Jusqu'à récemment, ils étaient également chargés d'effectuer une vérification rétrospective de toute procédure impliquant la classe sévère ou impliquant des primates non humains (article R214-120). Aujourd'hui, la réglementation tend vers une vérification rétrospective pour toutes les procédures expérimentales impliquant des animaux, quelles que soient la sévérité des procédures.

Les procédures de classe moyenne sont les plus fréquentes (50%) mais les procédures de classe légère ne sont pas très loin (31%). Les procédures de classe sévère représentent 14%, donc bien moins que les classes légères et modérées confondues. La classe sans réveil représente 4,6% des procédures expérimentales.

Les souris sont majoritaires dans toutes les classes de sévérité puisque c'est l'animal le plus utilisé. A l'inverse, on peut noter que 20,8% des porcs sont utilisés dans des classes sans réveil, ce qui est assez conséquent. On peut supposer que leur utilisation massive dans le domaine de la chirurgie en est la cause. C'est le cas également des céphalopodes (41% utilisés dans les classes sans réveil).

5 – Niveau de gravité des procédures

Espèces	Sans réveil	Légère	Modérée	Sévère
Souris (<i>Mus musculus</i>)	63 196	282 871	628 523	175 600
Lapins (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	1 021	43 313	124 821	3 066
Rats (<i>Rattus norvegicus</i>)	12 432	74 902	53 828	23 881
Poissons zèbres (<i>Danio rerio</i>)	1 656	15 097	34 152	16 500
Cochons d'Inde (<i>Cavia porcellus</i>)	301	21 879	27 775	367
Poules, coqs et poulets (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	324	51 214	22 639	3 421
Dindons (<i>Meleagris gallopavo</i>)		2 083	11 781	
Saumon, truite, ombles et ombres (<i>Salmonidae</i>)	1 390	25 956	8 935	13 906
Autres poissons	1 173	34 835	8 490	19 930
Poissons (spp. from families e.g. Serranidae, Moronidae)	949	3 595	6 014	6 354
Hamsters dorés (<i>Mesocricetus auratus</i>)	115	4 512	5 775	1 822
Autres oiseaux		5 456	4 649	86
Porcs (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	3 139	7 251	4 017	627
Moutons (<i>Ovis aries</i>)	512	2 466	1 427	182
Chiens (<i>Canis familiaris</i>)	34	2 979	1 187	183
Macaque cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>)	16	2 363	780	117
Reptiles		243	596	
Autres rongeurs (other Rodentia)	40	869	592	4
Gerbilles de Mongolie (<i>Meriones unguiculatus</i>)		112	303	8
Xénopes (<i>Xenopus laevis</i> and <i>Xenopus tropicalis</i>)	112	3 380	254	78
Chevaux, ânes et croisements (<i>Equidae</i>)		454	214	
Furets (<i>Mustela putorius furo</i>)		88	163	
Bovins (<i>Bos primigenius</i>)	1	1 646	161	98
Autres amphibiens	396	860	126	484
Chèvres (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	105	357	117	
Céphalopodes	466	560	108	
Chats (<i>Felis catus</i>)	4	913	90	11
Hamsters de Chine (<i>Cricetulus griseus</i>)		6	50	
Macaques rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	3	26	40	7
Autres mammifères	38	146	34	
Marmosets et tamarins	2	73	21	1
Prosimiens	8	25	15	12
Babouins (<i>Papio spp.</i>)		24	15	1
Autres carnivores	17	1 407	4	
Singes vervets (<i>pygerythrus</i> or <i>sabaeus</i>)			2	1
Saimiri (eg. <i>Saimiri sciureus</i>)	4	25	1	
Autres espèces de singes de l'ancien monde	11			
Total général	87 465	591 986	947 699	266 747

Gravité	Total
Sans réveil	87 465
Légère	591 986
Modérée	947 699
Sévère	266 747
Total général	1 893 897

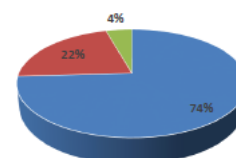
Figure 7 Niveau de gravité des procédures - Enquête statistique 2021 sur l'Utilisation des Animaux à des fins scientifiques - Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

f. Statut génétique des animaux

Comme nous le verrons plus bas, certains modèles animaux sont génétiquement modifiés pour créer des modèles spécifiques de certaines pathologies par exemple. Du fait de leur large utilisation, ce sont bien entendu les souris qui sont les animaux

Espèces	Animaux avec altération génétique sans phénotype dommageable	Animaux avec altération génétique avec phénotype dommageable
Souris (<i>Mus musculus</i>)	356 850	78 258
Lapins (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	18 971	
Poissons zèbres (<i>Danio rerio</i>)	13 781	2 070
Rats (<i>Rattus norvegicus</i>)	13 285	2 499
Saumon, truite, ombles et ombres (<i>Salmonidae</i>)	1 254	
Xénopes (<i>Xenopus laevis</i> and <i>Xenopus tropicalis</i>)	557	
Autres poissons	325	
Moutons (<i>Ovis aries</i>)	60	
Porcs (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	30	
Prosimiens	15	
Chiens (<i>Canis familiaris</i>)	1	15
Total général	405 129	82 842
% par rapport au nombre total d'utilisations	21,4	4,4

Statut génétique des animaux



- Animaux sans altération génétique
- Altération génétique sans phénotype dommageable
- Altération génétique avec phénotype dommageable

Figure 8 Statut génétique des animaux - Enquête Statistique 2021 sur l'Utilisation des Animaux à des fins scientifiques - Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

modifiés génétiquement les plus souvent utilisés (90% des animaux modifiés génétiquement sont des souris).

Mais au sein même de toutes les souris utilisées en expérimentation, c'est 40 % qui sont modifiées génétiquement, le reste des souris utilisées (60%) sont des souris non modifiées. Dans le top des espèces génétiquement modifiées, on trouve également le lapin, le poisson zèbre, puis le rat.

L'enquête distingue les altérations génétiques avec ou sans phénotype dommageable pour l'animal. Parmi tous les animaux génétiquement modifiés, environ 17% ont un phénotype dommageable et 83% ont un phénotype non dommageable.

g. Objet des utilisations d'animaux

L'enquête a comparé les domaines d'utilisation des animaux en recherche : recherche fondamentale, recherche appliquée sur les pathologies (humaine ou animale), études toxicologiques ou réglementaires pour les médicaments humains ou vétérinaires (comme vu plus haut), protection de l'environnement naturel, recherche en vue de conservation des espèces, enseignement supérieur ou formation, enquêtes médico-légales, et maintenance des colonies d'animaux génétiquement altérés.

Le domaine d'application qui emploie le plus d'animaux est la recherche fondamentale : 38% des animaux utilisés servent à la recherche fondamentale. Puis viennent les études toxicologiques et réglementaires pour la mise au point de médicament (28%), et la recherche appliquée en 3^{ème} position avec 25% des animaux utilisés.

Espèces	Recherche fondamentale	Etudes toxicologiques et réglementaires	Recherche appliquée	Maintenance de colonies	Préservation des espèces	Formation	Protection de l'environnement
Souris	532 189	231 154	304 278	61 050	5 981	15 511	27
Rats (<i>Rattus norvegicus</i>)	48 980	52 963	40 560	7 995	120	14 425	
Poules, coqs et poulets	37 327	11 572	28 567			132	
Autres poissons	37 264	186	4 655		20 287	222	1 814
Poissons zèbres	20 557	972	45 110	509	100	157	
Saumon, truite, ombles et ombres	10 149	21	18 106		21 610		301
Poissons	9 285	55	6 567		855		150
Autres oiseaux	3 996	500	4 332			92	1 271
Moutons	2 447	597	1 432			111	
Lapins	2 019	159 460	10 343			399	
Xénopes	1 911	78	1 835				
Porcs	1 898	1 483	9 416			2 205	32
Hamsters dorés	1 846	1 767	8 169			442	
Autres amphibiens	1 571		120		110	65	
Bovins	1 200	515	179			12	
Autres rongeurs	1 113	10			375	7	
Céphalopodes	1 026						108
Reptiles	830					9	
Cochons d'Inde	599	48 962	209			544	8
Chèvres	477	12	90				
Macaque cynomolgus	367	2 296	613				
Chevaux, ânes et croisements	327	68	268		5		
Chats	299	389	321			9	
Gerbilles de Mongolie	269	154					
Chiens	212	3 111	961	7		92	
Autres mammifères	174	17	4			23	
Prosimiens	60						
Macaques rhesus	48	4	24				
Marmosets et tamarins	37	58	2				
Babouins	27	1	12				
Autres carnivores	21		1 407				
Autres espèces de singes	11						
Furets	9	10	232				
Saimiri	5	25					
Singes vervets			3				
Dindons		12 025	1 836			3	
Hamsters de Chine		6	50				
Total général	718 550	528 471	489 701	69 561	49 443	34 460	3 711
%	37,9	27,9	25,9	3,7	2,6	1,8	0,2

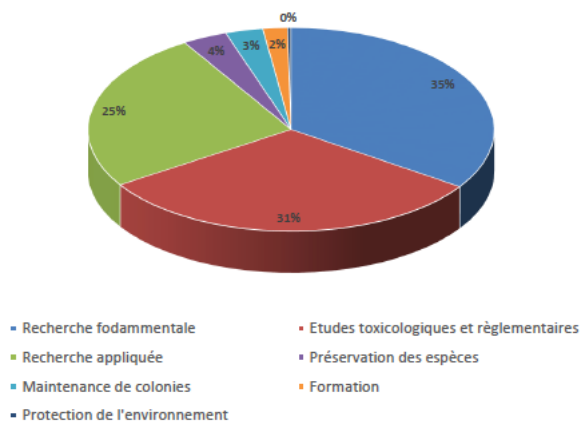


Figure 9 But des utilisations d'animaux - Enquête statistique 2021 sur l'Utilisation des Animaux à des fins scientifiques - Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

h. Production d'origine animale, contrôle qualité et obligations législatives ou réglementaires

Cette partie de l'enquête est fournie sous la seule forme d'un tableau, sans plus de précision. Elle semble reprendre plus en détails les différentes sous-catégories

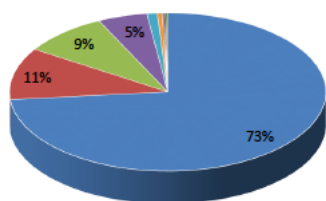
d'utilisation des animaux dans le domaine des études toxicologiques et réglementaires : production d'origine animale et contrôle qualité, produit à usage médical, produit à usage vétérinaire, appareils médicaux, industrie chimique, tests de produits phytosanitaires, ...

Espèces	Production d'origine animale, contrôle qualité	Produit à usage médical	Produits à usage vétérinaire	Appareils médicaux	Industrie chimique	Tests de produits phytosanitaires	Biocides	Autres	Produits alimentaires	Sécurité des animaux, travailleurs et environnement	Total
Souris	91 938	119 047	13 442	4 621	490	786	721	50	59		231 154
Rats	3	36 686	90	1 888	10 745	2 293	559	398	295	6	52 963
Cochons d'Inde	164	31 905	1 784	14 567	463		79				48 962
Lapins	132 338	20 204	781	4 164	1 800		44			129	159 460
Chiens	193	1 905	909	34	32				38		3 111
Macaque cynomolgus	522	1 774									2 296
Poules, coqs et poulets	674	772	9 720						49	357	11 572
Porcs		598	781	80					16		1 475
Gerbilles de Mongolie	28	126									154
Hamsters dorés		112	1 566	89							1 767
Marmosets et tamarins	46	12									58
Chevaux, ânes et croisements	14		54								68
Moutons	413		137	47							597
Bovins	3		512								515
Autres oiseaux	24		476								500
Xénopes					78						78
Poissons zèbres					972						972
Autres poissons					6			180			186
Dindons	11 832		193								12 025
Poissons					55						55
Saumon, truite, ombles et ombres					21						21
Hamsters de Chine				6							6
Autres rongeurs							10				10
Furets (<i>Mustela putorius furo</i>)	10										10
Porcs (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	8										8
Chèvres (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	12										12
Macaques rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	4										4
Babouins (<i>Papio spp.</i>)	1										1
Saimiri (eg. <i>Saimiri sciureus</i>)	25										25
Autres mammifères	17										17
Chats			299						90		389
Total général	238 269	213 141	30 744	25 496	14 662	3 079	1 413	628	547	492	528 471
%	45,1	40,3	5,8	4,8	2,8	0,6	0,3	0,1	0,1	0,1	100,0

Figure 10 Production d'origine animale, contrôle qualité et obligations législatives ou réglementaires - Enquête statistique 2021 sur l'Utilisation des Animaux à des fins scientifiques - Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

i. Domaines des obligations législatives ou réglementaires

73% des utilisations d'animaux dans le domaine toxicologique et réglementaire servent à la validation de produit à usage médical, et 11% à la validation de produit à usage vétérinaire. Ces deux cas représentent la grande majorité de l'utilisation d'animaux dans ce domaine. Le reste concerne les appareils médicaux, l'industrie chimique, etc. comme nous avons pu le voir plus haut.



- Produit à usage médical
- Produits à usage vétérinaire
- Appareils médicaux
- Industrie chimique
- Tests de produits phytosanitaires
- Biocides
- Produits alimentaires
- Sécurité des animaux, travailleurs et environnement
- Autres

Figure 11 Domaines des obligations législatives ou réglementaires - Enquête statistique 2021 sur l'Utilisation des Animaux à des fins scientifiques - Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

3. Rapport de la Commission Européenne sur la mise en œuvre de la directive 2010/63/UE(19)

La réglementation européenne impose aux États membres de transmettre à la commission un rapport sur la mise en œuvre de la directive 2010/63/UE. Le premier rapport paru porte une durée de 5 ans, de 2013 à 2017. Je vais détailler ici les principaux points de ce rapport.

Pour rappel, ce dernier concerne les 28 États membres de l'Union Européenne sur cette période. Les données sont donc assez hétérogènes car, bien que tous respectent la législation européenne, chacun a des fonctionnements plus ou moins différents.

a. *Évaluation et autorisation des projets*

Tous les États membres ont des structures chargées d'évaluer et autoriser les projets, certains au niveau national, d'autres au niveau local, afin de s'assurer que les procédures suivent la réglementation et utilisent un nombre d'animaux réduit au strict nécessaire. La législation oblige les différentes autorités à donner une réponse aux projets au bout de 40 jours maximum (voire 15 jours de plus si cela est justifié).

La plupart des projets sont autorisés car ils sont souvent révisés au cours de la procédure, et les expérimentateurs la modifient en conséquence. En France en 2017, les 3708 projets déposés ont tous été autorisés.

État membre	Nombre de projets autorisés en 2017	Nombre total de décisions (projets autorisés et rejetés)	Nombre de projets rejetés (calculé)	Nombre de décisions >40 jours	Proportion >40 jours sur la totalité des décisions
AT	717	721	4	10	1 %
BE	1 605	1 621	16	146	9 %
BG	23	23	0	9	39 %
CY	6	6	0		
CZ	528 ^{*)}	528	0 ^{*)}	3	1 %
DE	3 800	3 800	0	3 000	79 %
DK	269	269	0	31	12 %
EE	17	17	0	0	0 %
EL	175	183	8	15	8 %
ES	1 569	1 569 ^{*)}	0 ^{*)}	84	5 %
FI	124	124	0	0	0 %
FR	3 708	3 708	0	2 433	66 %
HR	47	50	3	9	18 %
HU	206	271	65	135	50 %
IE	120	120	0	3	3 %
IT	1 005	1 264	259	929	74 %
LT	24	24	0	24	100 %
LU	22	22	0	22	100 %
LV	13	15	2		
MT	1	1	0	0	0 %
NL	431	440	9	31	7 %
PL	774	914	140		
PT	56	56	0	34	60 %
RO	114	114	0	0	0 %
SE	657	662	5	20	3 %
SI	18	28	10	12	43 %
SK	92	93 ^{*)}	1 ^{*)}	0	0 %
UK	587	587	0	1	0 %

Figure 12 Décisions d'autorisation de projets par Etat membre en 2017 - Rapport de la Commission Européenne sur la mise en œuvre de la directive 2010/63/UE

b. Animaux élevés, mis à mort mais non utilisés

Comme nous avons pu le voir plus haut, les statistiques annuelles sur l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques ne concernent que les animaux utilisés dans des procédures scientifiques, mais ne s'appliquent pas aux animaux mis à mort pour leurs tissus et organes, ni aux animaux utilisés pour la création et l'entretien de lignée génétiquement modifiée. Les Etats membres ont obligation de fournir ces données une fois tous les cinq ans à la Commission Européenne.

Dans l'Union Européenne, 12 597 816 animaux ont été élevés, mis à mort, et non utilisés dans des procédures pendant l'année 2017. Le rapport ne détaille pas les données propres à chaque pays, ni les raisons spécifiques de la non-utilisation dans les procédures. Il s'agit en grande partie d'animaux mis à mort pour le prélèvement de tissus et organes (pour des méthodes *in vitro*), d'animaux qui ne convenaient pas pour des raisons scientifiques, ou des animaux tombés malades et mis à mort avant d'être utilisés. Il se peut également qu'en raison d'une variation de l'offre et de la demande, certains animaux soient mis à mort faute « d'acheteurs ».

83% de ces animaux sont des souris, et 7% des poissons zèbre.

Types d'animaux	Nombres
Nombre d'animaux conventionnels élevés, mis à mort et non utilisés dans des procédures	6 484 535
Nombre d'animaux génétiquement normaux (descendance de type sauvage) issus de la création d'une nouvelle lignée génétiquement modifiée, élevés et mis à mort	525 085
Nombre d'animaux élevés et mis à mort pour l'entretien d'une lignée génétiquement modifiée établie (ceux non visés par une autorisation de projet et exclus des rapports statistiques annuels)	5 588 196
Total	12 597 816

Figure 13 Nombre d'animaux élevés, mis à mort et non utilisés dans des procédures dans l'UE en 2017 - Rapport de la Commission Européenne sur la mise en oeuvre de la directive 2010/63/UE

Il est difficile de relier les différentes données car certaines parlent du nombre d'utilisations (et donc un animal peut être comptabilisé plusieurs fois), alors que d'autres comptabilisent le nombre d'animaux. Mais, à titre de comparaison, en 2017, on recense 9 millions d'utilisations d'animaux à des fins scientifiques dans l'Union Européenne (donc sans compter les animaux mis à mort mais non utilisés dans des procédures)(20).

c. Approvisionnement en primates non humains

Tous les établissements européens d'élevage de primates agréés proposent uniquement des animaux issus de la seconde génération (F2), comme l'encourage la directive. Cependant, la grande majorité des primates utilisés proviennent d'Afrique

ou d'Asie, où la juridiction est différente. De ce fait, même si une grande partie des primates sont de deuxième génération, ce n'est pas le cas de tous.

d. *Dérogations accordées*

Selon la législation, des dérogations peuvent parfois être accordées de manière exceptionnelle lorsque cela est scientifiquement justifié. Le rapport mentionne que « 15 Etats membres ont indiqué avoir accordé des dérogations en vue d'utiliser des animaux non élevés à des fins scientifiques, essentiellement pour effectuer des travaux dans la nature, ou sur des chiens et chats de compagnie dans le cadre d'études vétérinaires afin d'étudier des maladies cliniques et de nouveaux traitements. » Il fait également mention d'autorisation pour mener des procédures en dehors d'un établissement utilisateur (travaux sur des espèces dans leur milieu naturel, ou sur des animaux de ferme par exemple).

La plupart des Etats membres ont aussi accordé des dérogations aux normes d'hébergement et de soin (dimensions de cages inférieures, densité de peuplement supérieur à la loi pour étudier le mécanisme de propagation de maladies infectieuses, hébergement individuel, etc.).

Le rapport ne fournit pas de données quantitatives quant à ces dérogations.

e. *Retraits d'autorisation de projet et d'agrément des éleveurs, fournisseurs et utilisateurs*

9 Etats membres (sur les 28) ont indiqué avoir retiré des autorisations de projet par crainte relative au bien-être animale, par mauvaise méthode expérimentale, ou pour d'autres raisons. 19 Etats membres déclarent n'avoir retiré aucune autorisation de projet sur la période 2013-2017.

Concernant les agréments d'éleveurs, fournisseurs et utilisateurs, il y a eu très peu de retrait dans les pays membres (un Etat membre a fait mention de dégâts des eaux et donc d'un retrait de l'autorisation dans ces conditions).

f. Sanctions juridiques

23 pays membres ont indiqué avoir eu recours à des sanctions (administratives ou pénales selon les cas) pour les motifs suivants :

- Application des procédures sans autorisation nécessaire
- Tenue des registres inadaptées
- Formation insuffisante
- Non respect des exigences d'hébergement et de soins

La plupart des sanctions sont d'ordre administrative, les sanctions juridiques étant le plus souvent réservées aux cas les plus graves (souffrance inutile des animaux).

4. Modèle de la souris

En 2017, la souris *Mus musculus* représentait plus de 60% des animaux utilisés en France en recherche(21). C'est l'animal le plus utilisé en recherche. Pourquoi la souris est-elle un si bon modèle ?

a. Caractéristiques biologiques

La souris est surtout utilisée dans le domaine de la recherche médicale depuis le XX^{ème} siècle, et elle est devenue aujourd'hui un modèle expérimental incontournable. De ce fait, c'est un animal qu'on connaît extrêmement bien au niveau génétique notamment. Elle est d'ailleurs le premier animal dont le génome a été entièrement séquencé après l'homme(22).

Caractéristiques physiologiques générales(22) :

- Durée de vie : 1 à 2 ans
- Fréquence respiratoire : 160/min
- Fréquence cardiaque : 600 battements/min
- Température corporelle : 37°C
- Poids :
 - o Femelle : 18 à 25 g à l'âge adulte
 - o Mâle : 20 à 40 g à l'âge adulte

- Maturité sexuelle :
 - o Femelle : 6 à 8 semaines
 - o Mâle : 4 à 6 semaines
- Cycle de reproduction : la gestation dure environ 20 jours. La souris femelle présente plusieurs ovulations dans l'année (non déclenchée par le coït). Ainsi, le cycle œstral d'une souris dure environ 4 à 5 jours, et l'œstrus dure une dizaine d'heures (période pendant laquelle l'accouplement est possible). La souris peut donner des portées allant de 3 à 14 bébés. Les bébés naissent aveugles et nus.

La souris est assez proche de l'homme concernant la façon dont ses organes fonctionnent et sont régulés. Les mécanismes physiologiques impliqués dans le fonctionnement de l'organisme murin peuvent souvent être comparés à ceux de l'homme. Certaines différences sont à connaître afin de choisir le modèle le plus adapté pour son expérimentation et d'interpréter les résultats correctement, nous en parlerons plus bas. Lorsque les mécanismes de régulation diffèrent, il est possible « d'humaniser » des souris en remplaçant un gène murin par un gène humain impliqué dans la pathologie humaine ciblée par l'équipe de recherche.

b. Avantages du modèle

La souris est l'animal le plus utilisé en recherche et ceci, pour plusieurs raisons.

Premièrement, il existe un très fort taux de proximité génétique entre l'homme et la souris : 80% des gènes codant pour une protéine chez l'homme ont un orthologue chez la souris, et 72% des gènes codant pour une protéine chez la souris ont un orthologue chez l'homme(23). Autrement dit, une grande partie de nos gènes ont un équivalent chez la souris, et vice-versa. Cette proximité, ainsi que d'autres avantages pratiques, en fait un excellent modèle animal. Bien que des résultats obtenus chez des espèces ayant un plus fort taux de proximité génétique – comme les primates – soient plus fiables et mieux transposables, ces animaux sont généralement utilisés dans des cadres scientifiques bien précis (absence d'autre espèce pertinente pour l'étude) afin de les protéger. En somme, la souris représente un bon compromis.

Deuxièmement, ce qui fait de la souris un bon modèle, c'est qu'elle est facilement manipulable et docile. Sa faible corpulence n'implique pas forcément de gros équipements ni pour les analyses ni pour les conditions d'hébergement, ni pour l'alimentation. C'est un point non négligeable compte tenu du nombre d'animaux utilisés. La gestion de 50 souris s'avère beaucoup plus pratique que celle de 50 chimpanzés par exemple et nécessite moins d'installations spécifiques, bien que les souris aient leurs propres besoins en termes d'hébergement et d'enrichissements.

Ce sont également des animaux qui se reproduisent vite. Une souris adulte peut réaliser 5 à 15 portées par an, ce qui est particulièrement utile lors des études de reproduction où l'on souhaite étudier l'effet d'un médicament sur plusieurs générations.

Enfin, et ce n'est pas le moindre des avantages, nous disposons d'un grand nombre de connaissances sur cet animal : son génôme qui a été entièrement séquencé, sa physiologie, ses pathologies, son immunité, etc. Cette grande base de données nous permet souvent de combler les différences entre l'homme et la souris : on peut discuter d'un résultat obtenu chez la souris au regard des connaissances acquises sur ce modèle. Par exemple, on sait que la souris est particulièrement sensible aux tumeurs : voir apparaître une tumeur chez une souris à la suite de la prise d'un médicament n'apparaîtra pas forcément comme significatif. Le fait de savoir qu'une souris est sensible à la cancérogénèse permet de détecter même un faible cancérigène lorsqu'on applique les bonnes conditions, avec notamment un groupe témoin pour comparer le taux d'incidence. Connaître les différences entre le modèle d'étude – ici, la souris – et l'homme est un point crucial qui permet l'interprétation de données obtenues chez la souris. Bien connaître son modèle en termes de comportements et de besoins permet aussi de meilleures conditions d'hébergement et de bien-être. Un chercheur compétent veille à ne pas mettre en situation de stress plus que nécessaire son modèle expérimental, sous peine de fausser les résultats obtenus. Il lui est donc indispensable de connaître les signes de stress et de douleur chez la souris.

De plus, cette grande connaissance couplée aux nouvelles technologies dont nous disposons, permet aujourd’hui de fabriquer des modèles plus précis et aboutis : ce sont les modèles génétiquement modifiés. De nombreuses souches de souris (ainsi que de rats) ont été modifiées génétiquement, soit par l’insertion, soit par la modification, soit par l’effacement d’un gène, afin de reproduire une pathologie par exemple, et en faire un modèle d’étude plus spécifique.

La souris a ainsi démontré de nombreuses fois son utilité et sa nécessité dans la recherche médicale. Elle a permis de démontrer l’efficacité de la pénicilline en tant qu’antibiotique en 1940 : découverte par Alexander Fleming en 1929, la pénicilline n’avait jusque-là suscité que peu d’intérêt, lorsque Howard Florey et Ernst Chain la testèrent sur un groupe de souris préalablement infectées par une suspension bactérienne. Le test s’est avéré concluant et la pénicilline a alors été produite en grande quantité pour les besoins de la population(24).

c. *Présentation des différentes souches et domaines d’application*

D’après l’étude menée par Labome(25) qui a examiné des milliers de publications sur Pubmed, les souches de souris les plus fréquemment utilisées sont C57BL/6 et BALB/c. Nous allons les détailler, ainsi que d’autres souches.

La plupart des souches de souris que nous allons voir sont albinos, c’est un phénotype très fréquent chez les souches de laboratoire. En effet, ces souches présentent une mutation du gène de la tyrosine kinase, enzyme permettant la synthèse de mélanine. Cette mutation a été entretenue par croisements pour obtenir les différentes lignées de souris aujourd’hui utilisées.

Pour commencer, je transpose ici le tableau qui a été réalisé par Labome et qui retrace le nombre de publications par an citant les différents types de souris utilisées :

	2018	2015	2010	2000
<i>Souris consanguines</i>	30192	29504	24403	11739

<i>Souris transgéniques</i>	13781	15653	14380	5739
<i>Souris knockout</i>	8876	9742	9182	3400
<i>Souris congéniques</i>	18	28	111	44
<i>Autre</i>	33085	34528	30080	16308

Figure 14 Nombre de publications par an utilisant des souris consanguines, transgéniques, knock-out, congéniques, ou autre - *Laboratory Mice and Rats, Mary Johnson, Synatom Research, Princeton, New Jersey, United States.*

Ce sont bien le nombre de publications qui citent les différents types de souris, et non le nombre de souris utilisés, bien que les deux paramètres soient liés. On peut voir que les souris consanguines représentent le type majeur utilisé dans la recherche, ou tout du moins cité par les auteurs dans leurs recherches.

i. Nomenclature

Avant d'entamer la description des différentes souches, un très léger rappel de nomenclature s'impose. Le laboratoire Jackson, un des plus gros fournisseurs de souris et de rats au monde, a élaboré un guide rapide pour comprendre la nomenclature des souches de souris (ci-dessous). Ce petit guide a été conçu sur la base de la nomenclature officielle donnée par l'*International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice*(26).

On y apprend que la plupart des souris de laboratoires sont issues des espèces *Mus musculus musculus* et *Mus musculus domesticus*, et un tout petit peu de *Mus musculus molossinus* et *castaneus*. Pour ces raisons, les souris de laboratoire ne devraient pas être nommée selon leur nom d'espèce, mais plutôt par leur nom de souche spécifique. Tous les noms des souches ont été enregistrés dans la Mouse Genome Database.

Il existe un code de nomenclature indiquant le laboratoire de production de la souche en question, afin de reconnaître l'institut ou le laboratoire qui détient notamment les stocks de la souche. Ce code est généralement composé de 3 à 4 lettres (la première en majuscule, les autres en minuscules). Dans le cas du laboratoire Jackson, c'est la

lettre « J » qu'on peut voir à la fin du nom des souches. Pour le laboratoire Charles River, il s'agit du code « Cr ».

Pour les lignées consanguines obtenues par croisement entre frères et sœurs sur au moins 20 générations, les noms commencent généralement par une combinaison de lettres en majuscules et/ou de chiffres. La plupart de ces souches ont des noms bien définis dont la liste est disponible. Au sein des lignées consanguines, on peut avoir des sous-souches : c'est-à-dire qu'une souche consanguine bien établie peut diverger génétiquement en deux sous-souches avec le temps. C'est le cas notamment lorsque deux branches sont séparées après 20 générations de croisement mais avant 40 générations (on a toujours quasiment la même souche, mais le peu de différences suffit à en faire deux sous-souches). Pour différencier les « substrains », on attribue le code du laboratoire (où la seconde souche est apparue) après un slash. Le nombre devant le lab code indique que le laboratoire a donné lieu à plusieurs substrains.

Les lignées hybrides provenant du croisement de deux souches consanguines sont nommées par l'abréviation d'abord de la souche mère puis de la souche père, suivi de F1 (pour hybride de première génération). Dans le cas de B6129SF1/J (ci-dessous), il s'agit d'un hybride entre la femelle B6 (abréviation de la souche C57BL/6) et le mâle 129S (abréviation de la souche 129S1/SvlmJ) de première génération, obtenu par le laboratoire Jackson.

Ensuite, les souches qui ont été modifiées génétiquement sont nommées en commençant par leur souche de base (celle qui a été manipulée). Pour les souches qui présentent une mutation, soit spontanée soit induite, le nom de la souche de base est suivi du gène et de l'allèle muté.

QUICK GUIDE TO MOUSE NOMENCLATURE

Inbred and Hybrid

Inbred*

C57BL/6J = B6
129S1/SvImJ = 129S

F1Hybrid*

B6129SF1/J
♀ ♂

*Standard strain abbreviations. Learn more at jax.org/nomenclature.

Spontaneous or Induced Mutation

C57BL/6J-Apc^{Min}/J

Background Strain Affected Gene Mutant Allele

*Mixed Background

Knock-out, Knock-in or Floxed

B6;129P-Tcrb^{tm1Mom}/J

Background (Recipient) Strain Donor Strain Affected Gene Allele # Targeted Mutation Creator Lab Code

Holding Site Lab Code

Transgenic (Tg)

B6.Cg-Tg(PDGFB-APP)5Lms/J

**Congenic N ≥ 5 Transgenic [Promoter-Gene] Founder Line

Endonuclease-mediated

C57BL/6J-Ngly1^{em9}Lutz^y/J

Background Strain Affected Gene Endonuclease-mediated Mutation Allele # Creator Lab Code

1-800-422-6423
(US, Canada & Puerto Rico)
1-207-288-5845
(from any location)
jax.org/nomenclature



LT0018 US 02 09/2018

*Mixed Strain Background = semicolon (;)
Backcrossed to recipient inbred strain < 5 generations

** Congenic or Incipient Congenic = period (.)
Backcrossed to recipient inbred strain ≥ 5 generations

Figure 15 Guide de nomenclature des souches - The Jackson Laboratory

ii. Souris C57BL/6

Cette souris porte également le nom de « Black 6 ». Il s'agit d'une souche consanguine, issue du croisement entre une femelle N.57 et un mâle N.52, créée par C.C. Little en 1921(27). C'est une souche très répandue qui sert de « base » en génétique et à la création d'autres modèles de souris. Aujourd'hui, seuls les laboratoires Jackson Laboratory et Charles River en Europe et au Japon assurent l'élevage des souches issues des colonies primaires de Jackson Laboratory(27).

Cette souche est peu sensible aux tumeurs spontanées(28). Son pelage est de couleur noire, non agouti. Le gène agouti permet de déterminer si le pelage est bicolore (= agouti) ou unicolore (non agouti).

Caractéristiques(28) :

- Perte d'audition tardive liée à l'âge et résistance aux crises audiogènes.
- Sensible aux régimes d'induction au diabète de type II et à l'athérosclérose : c'est pour cette raison qu'elle est utilisée dans ces deux domaines de recherche.
- Alopécie : dépilation caractéristique de la souche attribuée à des phénomènes comportementaux de type overgrooming/barbering (toilette excessive)
- Hydrocéphalie héréditaire qui touche 1 à 4% des souris
- Présence de cloison vaginale
- Faible densité osseuse
- Incidence plus élevée de malocclusion
- Taux élevé de microphthalmie et autres anomalies oculaires
- Addiction à la morphine et à l'alcool
- Porteuse de la délétion du gène Nnt (insuffisance en glucocorticoïdes)

En termes de comportement, Janvier Labs indique que la Black 6 est active et assez agressive, mais reste facile à manipuler. Son espérance de vie est de 2 ans (la moyenne se situe généralement autour de 1 an).

Son utilisation est très répandue et concerne de nombreux domaines de la recherche, mais plus précisément, elle est utilisée dans le diabète et l'obésité et comme fond génétique pour le développement de modèles transgéniques. Elle est à la base de

nombreux croisements. C'est aussi une souris classiquement utilisée dans les études de toxicité et d'innocuité puisqu'elle est très bien connue (cela permet de meilleures comparaisons avec d'autres résultats sur ces mêmes souris).

Par ailleurs, lors de l'achat de souris de laboratoire, des certificats sont fournis pour garantir la standardisation de la souche et présenter tout un tas de paramètres propres à la souche : données biochimiques, données hématologiques, courbe pondérale, certificats sanitaires (SPF/SOPF), etc. La standardisation de la souche permet d'obtenir des résultats fiables et relativement homogènes.

Il existe des « sous-souches » au sein de cette C57BL/6 qui peuvent avoir des différences.

Exemples de recherche utilisant la C57BL :

- Étude sur l'influence du diabète sur la tolérance ischémique myocardique : chez la souris C57BL/6, le diabète de type 2 impacte la tolérance ischémique du myocarde, mais ce n'est pas le cas du diabète de type 1(29).
- Etude des effets de différents antipsychotiques sur l'activité métabolique et proliférative des lymphocytes de souris C57BL/6 : parmi les différentes molécules testées, la chlorpromazine présente un effet immunosuppresseur plus important que les autres(30).
- Développement d'un modèle murin de mélanome : le modèle C57BL6 a servi ici de « standard » sur lequel on a implanté des cellules tumorales d'un autre modèle génétique de souris, le modèle B16, pour étudier la réponse à certains traitements anticancéreux(31).

iii. Souris BALB/c

La lignée de cette souris a commencé en 1913 et s'est transmise de fil en aiguille à plusieurs personnes : d'abord le Dr J.Bagg (d'où le nom de BAL pour Bagg's Albino), puis le Dr C.C. Little, puis le Dr. MacDowell, ... jusqu'à arriver au Laboratoire Jackson grâce au Dr Snell(32). A ce moment-là, les souris s'étaient reproduites entre frères et sœurs depuis 26 générations (F26), en 1935. Il s'agit donc d'une lignée consanguine.

Le Dr Snell a ensuite envoyé certaines de ces souris, nommées alors BALB/c – le /c faisant référence au locus du gène de la couleur c/c –, au National Institutes of Health pour entretenir cette lignée, ainsi qu'au Jackson Laboratory.

La lignée s'est divisée et a évolué de manière indépendante en 3 souches distinctes :

- La BALB/c : initialement fondée par le Dr Snell et donnée au Laboratoire Jackson → cette colonie a été détruite lors d'un incendie des locaux du laboratoire, mais une partie de la lignée a été conservée par le Dr Scott
- La BALB/cJ : lignée issue de la descendance des BALB/c du Dr Scott
- La BALB/cByJ : issue du NIH puis renvoyée au Laboratoire Jackson (F136) en 1974

Cette souche est utilisée dans de nombreux autres domaines tels que la neurobiologie, l'immunologie, etc.

Autrefois, cette souris était utilisée pour la production d'ascite servant à obtenir des anticorps monoclonaux. Aujourd'hui, le recours aux animaux pour la production d'anticorps monoclonaux doit rester exceptionnelle et doit être justifiée car des alternatives existent(33). Actuellement, la production d'anticorps monoclonaux se fait *in vitro*, le plus souvent à partir de cellules ovariennes de hamster chinois(34).

La laboratoire Jackson fournit également des souris BALB/c présentant différentes mutations d'intérêt : Hld, Cdh23^{ahl}, etc. Cela permet d'affiner la recherche d'un modèle pour une pathologie particulière. De cette souche est issue la lignée BALB/c-nu : souris immunodéficente par la présence de la mutation autosomale récessive du gène Foxn1. Cette mutation provoque une aplasie du thymus induisant un déficit immunitaire.

Caractéristiques du modèle BALB/cByJ(35)

- Souche albinos
- Caractère plutôt agressif, bon reproducteur (meilleur que BALB/cJ)
- Production d'ascite supérieure à BALB/c

- Sensible à l'hydrocéphalie héréditaire et à la malocclusion

Caractéristiques du modèle BALB/cJ :

- Souche albinos
- Difficile à élever
- Sensible à des blépharites ulcéraives et des abcès périorbitaux, à l'hydrocéphalie héréditaire et à la malocclusion.

La lignée BALB/c sert, comme beaucoup d'autres, de fond congénique sur lequel fixer diverses mutations. On l'utilise pour faire des croisements et produire une lignée congénique : lignée homozygote pour le gène d'intérêt.

Exemples de recherches utilisant la souris BALB/c :

- Lien entre anxiété et microbiote intestinal(36) : des transplantations fécales ont été réalisées sur la souris BALB/c, de nature généralement anxieuse, à partir du microbiote d'une autre lignée de souris (souris SWISS du NIH qui est peu anxieuse). Cette étude a permis de faire le lien entre le microbiote intestinal et son action sur l'humeur, le système immunitaire, etc.
- Développement d'un modèle pour l'Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs(37) : mise au point d'un modèle prédictif de cette pathologie due à une occlusion des vaisseaux des membres inférieurs pouvant conduire à une amputation. Les chercheurs ont utilisé la souris BALB/c comme base afin de tester deux thérapies : l'administration de facteurs de croissance et la greffe de cellules progénitrices endothéliales visant à provoquer un processus de revascularisation. Cette souris présente pour cela des similitudes avec l'homme intéressantes : « la dégénérescence et le changement de statut métabolique des muscles (...) sont également observés dans le cadre de la pathologie humaine ».

iv. Souris SCID

SCID est l'acronyme pour Severe Combined ImmunoDeficiency. Il s'agit de souris immunodéprimées présentant une lymphopénie (les lymphocytes T et B sont absents), ainsi qu'une hypogammaglobulinémie.

C'est une mutation découverte par l'équipe de Bosma dans un élevage de souris consanguines pendant les années 1980(38). La découverte de cette mutation spontanée a permis de grandes avancées et la mise au point de nombreux modèles pathologiques, principalement utilisés en immunologie. L'absence de système immunitaire chez ces souris est particulièrement utile pour étudier des pathologies telles que le SIDA ou l'étude de greffes.

Il existe aujourd'hui plusieurs souches de souris SCID :

- Souris Fox Chase SCID ou CB17 SCID(39) : c'est la souche découverte par l'équipe de Bosma. Elle présente donc une absence de lymphocytes B et T mais ses cellules NK, ses macrophages, et ses granulocytes sont normaux.
 - o Souche albinos, congénique
 - o Particulièrement utilisée pour l'étude de xénogreffes et de tumeurs : du fait de leur immunodéficience, on peut étudier l'implantation de greffons sur ces souris (pas ou peu de rejet). Il est également possible de leur implanter des tumeurs afin d'observer le développement de ces dernières sans l'implication du système immunitaire. En revanche, du fait de la présence de cellules NK, ce modèle n'est pas le plus adapté pour la greffe de cellules humaines provenant du foie ou du thymus, ou pour la greffe de cellules souches hématopoïétiques(40).
 - o Haute sensibilité aux infections virales et bactériennes : leur hébergement doit se faire selon des conditions strictes afin d'éviter toute infection opportuniste qui pourrait perturber les expérimentations
 - o Haute sensibilité aux lymphomes : environ 15% de ces souris en développent de façon spontanée(39)
 - o Il peut y avoir des souris dites « leaky » - chez environ 2 à 10% des souris – qui développent des lymphocytes B et T fonctionnels, et chez lesquelles on peut détecter des taux non négligeables

d'immunoglobulines G et M. Ces taux sont généralement inférieurs à 1% mais il arrive qu'ils puissent être plus hauts dans de très rares cas(41).

- Souris NOD-SCID : il s'agit d'une souris NOD (Non-Obese Diabetic) chez laquelle on a implanté la mutation SCID. Comme la CB17-SCID, elle ne présente pas de lymphocytes T et B, mais contrairement à la première, elle ne possède pas de macrophage ni de cellules NK. Elle tolère mieux la transplantation de tumeurs humaines (pas suffisamment pour la transplantation de cellules humaines provenant du thymus ou du foie(42)).
- Souris NSG/BRG : ces lignées de souris proviennent du croisement entre une souris NOD-SCID (pour les souris NSG) ou une souris BALB/c-Rag2^{-/-} (pour les souris BRG) et une souris IL2R γ ^{-/-}. Cette dernière a permis d'apporter une mutation supplémentaire empêchant le développement des cellules NK(43). Cette lignée est une des plus immunodéficientes qui existe, et une des rares permettant la transplantation de cellules souches hématopoïétiques humaines. De plus, elle développe moins de tumeurs spontanées, allongeant ainsi sa durée de vie.

Exemples de recherches impliquant des souris immunodéficientes :

- Reproduction de l'infection par le VIH chez des souris BRG(44) : les chercheurs ont eu un recours au modèle RAG-hu, modèle humanisé établi à partir d'une souris SCID sur laquelle on a greffé des cellules souches humaines pour reproduire un système immunitaire « humain » fonctionnel. L'étude montre que ce modèle supporte une infection par le VIH (alors que d'autres modèles étaient trop fragiles et mourraient avant qu'on puisse observer ou tester un remède), et qu'il reproduit la virémie et la déplétion en T4 observée chez l'homme. C'est un modèle plus proche de la physiopathologie humaine.
- Utilisation des cellules CAR-T humaines dans le traitement de la leucémie : l'immunothérapie par CAR-T cells consiste à renforcer les défenses immunitaires du malade pour qu'il puisse lutter plus efficacement contre la leucémie. En l'occurrence, il s'agit de prélever chez le malade des lymphocytes et de les entraîner à reconnaître les cellules leucémiques pour qu'ils les éliminent. Les chercheurs ont utilisé des souris NOD-SCID afin de leur implanter

des lymphocytes T humain qui ciblaient l'antigène CD19, et ont montré que ces lymphocytes pouvaient éradiquer la tumeur. Aujourd'hui, la HAS a approuvé l'utilisation de deux thérapies à CAR-T cells : Kymriah et Yescarta dans le traitement de la leucémie aigue lymphoblastique.

Toutes les souris SCID dont nous avons parlé ci-dessus présentent une mutation autosomale récessive du gène *prkdc* (Protein Kinase DNA activated catalytic polypeptide) donnant un syndrome SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency). Mais ce ne sont pas les seules souris immunodéficientes. La souris « nude » est également très utilisée pour son absence de système immunitaire. Cette dernière présente une mutation provoquant une absence de thymus fonctionnel, et n'a donc pas de lymphocytes T(45). Ces souris sont appelées « nude » car elles n'ont pas de pelage (les follicules de croissance des poils sont défectueux chez cette souris).

Il existe encore de nombreux autres modèles murins dont nous n'avons pas parlé, notamment les souris Knock-Out chez lesquelles on invalide l'expression d'un gène par recombinaison homologue, afin de connaître sa fonction par exemple. Les modèles murins ont pris de l'essor depuis le début des années 2000 et on compte aujourd'hui une très grande diversité parmi les quelques 8000 modèles murins existants(46).

5. Modèle du rat

Tout comme la souris, le rat est un modèle emblématique de la recherche. Il était et reste très utilisé, souvent pour des raisons similaires à la souris, c'est-à-dire pour sa petite taille, sa reproduction nombreuse, et sa facilité d'entretien. Mais contrairement à ce qu'on pourrait croire, le rat n'est pas le second animal le plus utilisé en recherche, mais bien le troisième (après la souris et le poisson).

Le rat de laboratoire est issu de l'espèce *Rattus norvegicus*. C'est le premier animal que l'homme a domestiqué dans un but de recherche scientifique, et son génome (celui d'un rat Brown Norway) a été séquencé juste après celui de la souris et de

l'Homme(47). Le séquençage de son génome a permis de montrer que la plupart des gènes à l'origine de pathologie chez l'homme ont des équivalents chez le rat(47). A l'époque du projet de séquençage du génome du rat, il subsistait un doute quant à l'intérêt du projet, sachant que le génome de la souris avait déjà été séquencé et que les deux animaux sont phylogénétiquement proches. Cependant, l'étude a révélé que le génome du rat, bien que similaire à la souris (et à l'homme), présente bel et bien des différences avec son homologue murin. Le rat présente des gènes qui lui sont spécifiques et non partagés avec la souris.

a. *Caractéristiques biologiques*

Voyons plus en détail les principales caractéristiques physiques du rat de laboratoire(48) :

- Durée de vie : 2 à 3,5 ans
- Fréquence respiratoire : 70-115/min
- Fréquence cardiaque : 250-450 battements/min
- Température corporelle : 35,9-37,5°C
- Poids :
 - o Femelle : 250 à 300g à l'âge adulte
 - o Mâle : 450 à 520g à l'âge adulte
- Maturité sexuelle :
 - o Femelle : 9 à 15 semaines
 - o Mâle : 9 à 15 semaines
- Cycle de reproduction : chez la ratte, la gestation dure entre 21 et 23 jours. Elles sont polyoestriennes, c'est-à-dire que l'ovulation survient plusieurs fois dans l'année, en moyenne tous les 5 jours. Cependant, on peut stimuler l'œstrus, tout comme chez la souris, en introduisant un male dans une cage contenant des femelles (effet « Whitten »). Ce phénomène est déclenché par les phéromones du mâle(49,50).

De la même manière que pour la souris, il existe plusieurs souches de rat développées au fil des années afin de répondre à différents besoins de recherche. On distingue, ici

encore, les souches non consanguines (croisements entre rats appartenant à différentes lignées, donnant lieu à des individus hétérozygotes) et les souches consanguines (croisement entre frères et sœurs d'une même lignée, sur au moins 20 générations successives). Le choix entre souche consanguine ou non consanguine a son importance puisque, de manière générale, les souches hétérozygotes sont plus résistantes aux maladies et vivent plus longtemps. Ces dernières ont également un taux de fécondité plus élevé(26). Les souches non consanguines sont particulièrement utiles lorsqu'on souhaite étudier un groupe hétérogène d'individus, où la distribution du génotype est aléatoire. A l'inverse, si on veut pouvoir comparer les résultats selon les individus, il est préférable qu'ils soient génétiquement identiques et on optera alors pour une souche consanguine.

b. Les avantages du modèle

Les avantages du rat sont à peu près similaires à ceux de la souris : même s'il est plus gros que sa cousine, il reste d'une taille facile à entretenir, à manipuler, et avec une certaine facilité de reproduction. C'est également un animal qu'on connaît bien aujourd'hui, avec beaucoup de documentation sur les différentes souches, leur génotype, leur comportement, etc. Alors pourquoi choisir le rat plutôt que la souris ?

Tout d'abord, même s'il reste de petite taille, le rat est plus gros que la souris. Et c'est un avantage en soi car cela facilite les techniques chirurgicales ou les clichés d'imagerie. Cela permet également d'obtenir des échantillons plus importants, que ça soit pour les prélèvements de sang ou de tissus. En effet, certaines techniques d'analyse ont besoin d'un volume minimal pour fonctionner.

Le rat présente également l'avantage de vivre un peu plus longtemps que la souris, ce qui est particulièrement utile pour des études sur le vieillissement ou sur des pathologies neurodégénératives.

Plus que la souris, le rat démontre toute une palette de comportements différents, il est tout à fait capable d'apprendre et de mémoriser, ce qui en fait un très bon animal de compagnie. En recherche, ce trait d'espèce est utilisé pour des études portant sur

l'addiction (mécanisme d'apprentissage et de récompense). Un modèle a notamment été mis au point sur le binge drinking(51).

Enfin, il semblerait que le rat soit très proche de l'homme en termes de sensibilité hormonale et de développement tumoral, ce qui a donné lieu à de nombreuses découvertes en oncologie, dans le domaine du cancer de la prostate par exemple, avec la découverte de l'hormonothérapie (en partie grâce au modèle du rat) par C.B. Huggins.

Selon les besoins de l'étude, il sera préférable de choisir le rat plutôt que la souris, ou inversement. Comme nous l'avons maintes fois répété, le choix du modèle animal dépend de nombreux facteurs et une bonne connaissance des avantages et limites de chaque modèle est la clé pour permettre un choix pertinent et l'obtention de résultats fiables.

c. *Présentation des différentes souches et modèles d'application*

i. Wistar

Cette souche est très commune dans le domaine de la recherche et est utilisée dans de nombreuses spécialités telles que les maladies infectieuses, la pharmacologie, la toxicologie, l'oncologie, etc. Il s'agit d'une souche non consanguine, ce qui lui confère une certaine longévité. C'est une des premières souches de rat sélectionnée pour la recherche médicale, en 1906 par l'Institut Wistar. C'est également une souche qui a un fort taux de tumeurs spontanées, d'où son intérêt en oncologie.

Bien que ça soit une des premières souches de rat de laboratoire, ayant donné lieu à de nombreuses autres lignées, il s'est développé certaines différences entre le rat Wistar et les autres rats, que ça soit morphologiquement ou bien en termes de comportement. D'après Janvier Labs, le rat Wistar est facile à élever, mais a une moins bonne faculté d'apprentissage que le Long Evans. C'est un rat albinos. Il semblerait également que le rat Wistar ait une tête plus large et une queue plus petite que le Sprague-Dawley. Une étude montre par exemple, toutes les différences en termes de tumeurs qu'il peut exister entre le rat Wistar et le rat Sprague Dawley(52). L'auteur de

cette étude explique notamment que certaines tumeurs comme celles des glandes mammaires ont une incidence plus élevée chez les Sprague-Dawley (aux alentours de 72%) que chez les Wistar (aux alentours de 22%). Ce type de données met en évidence l'importance du choix de la souche dans une étude, ou tout simplement la connaissance de ces facteurs de confusion lorsqu'on interprète des résultats.

ii. Sprague-Dawley

Le Sprague Dawley (SD) est aussi une souche non consanguine albinos, créée en 1925 par Robert Dawley. Tout comme le Wistar, elle est utilisée très fréquemment en toxicologie et pharmacologie. Il semblerait qu'elle descende de la souche Wistar(53). Il s'agit d'un rat relativement docile, facile à manipuler et à entretenir.

Cette souche présente, elle aussi, un fort taux de tumeurs spontanées, à prendre en compte dans les études. Une étude japonaise réalisée en 1979(54) montre que la souche SD a un très fort taux de tumeurs endocrines, que ça soit chez les mâles ou les femelles. Cette incidence augmente logiquement avec l'âge des rats : plus les rats sont vieux, plus ils ont de probabilité de présenter une tumeur spontanée. Leurs recherches ont porté sur 100 rats Sprague Dawley, issus d'une colonie exempte de pathogènes. 81 rats ont survécu plus de 2 ans, et 79% d'entre eux ont développé des tumeurs. Ceci explique l'intérêt de la souche dans les études de toxicologie et d'oncologie, mais également la nécessité d'avoir toujours un groupe témoin. On pourrait tout à fait étudier l'effet cancérigène d'une substance sur une colonie de rats SD, et observer une forte incidence de tumeurs sur ce groupe, cela ne suffirait pas à démontrer le potentiel cancérigène de la substance en question car les rats SD développent naturellement des tumeurs au cours de leur vie. Il est donc particulièrement utile de toujours comparer les résultats à un groupe de rats témoin, afin de voir si l'incidence est plus élevée ou plus faible dans le groupe traité que dans le groupe contrôle. Cela permet de savoir si les résultats obtenus dans le groupe traité sont dus à la substance étudiée ou simplement à la particularité de la souche.

Le rat SD a par exemple été utilisé comme modèle d'ostéoporose. Il a permis de montrer l'intérêt d'une supplémentation en calcium dans cette pathologie(55). Nous

savons aujourd'hui qu'une supplémentation en calcium permet de prévenir les effets de l'ostéoporose. Les études sur l'ostéoporose ont été menées sur plusieurs souches de rat, notamment le SD et le rat Wistar. Une équipe de chercheurs s'est alors interrogé sur l'intérêt de ces deux souches comme modèle de l'ostéoporose(56) : peut-on obtenir les mêmes résultats avec ces deux souches ? Ils ont ainsi conclu que ces deux souches ne se valent pas en tant que modèle d'ostéoporose car l'incidence de l'ostéoporose est plus nette chez les rats SD que chez les rats Wistar. Cette étude ne contredit pas les conclusions émises sur l'ostéoporose, simplement que le choix du modèle a son importance dans l'interprétation des données. J'ai trouvé cela particulièrement intéressant car ça démontre qu'une seule étude ne suffit pas à prouver quelque chose, et c'est en s'interrogeant, en croisant les données, qu'on parvient à faire progresser nos connaissances.

iii. Long-Evans

Le Long-Evans est issu d'un croisement entre une femelle Wistar et un mâle sauvage de l'espèce *Rattus norvegicus*, en 1915. Son pelage est blanc sur l'ensemble du corps, et noir au niveau de sa tête (« cagoule noire »). Leur utilisation est répandue dans de nombreux domaines, mais principalement dans celui de l'apprentissage et du vieillissement. Contrairement aux précédents modèles, le rat Long-Evans présenterait une résistance à l'oncogénèse (ce qui en fait donc un bon sujet pour des études sur le vieillissement).

iv. Rat BB

Tout comme la souris NOD, cette souche de rat développe un diabète de type 1 de façon spontanée. Elle a été découverte dans les années 1980 et serait issue de rats Wistar. Le développement de cette pathologie auto-immune est similaire à celle de l'homme, commençant par une inflammation du pancréas. C'est donc une souche qui est principalement utilisée en tant que modèle pour le diabète de type 1.

Les souches de rat BBDP (BioBreeding Diabete Prone) développent donc spontanément un diabète de type 1, mais certaines sont résistantes à ce développement : ce sont les rats BBDR (Bio-Breeding Diabete Resistant). Ils

proviennent de la même lignée, possèdent les mêmes gènes de prédisposition au diabète de type 1, mais ne développent pas cette pathologie (lorsqu'ils sont élevés dans un environnement exempt de pathogènes viraux)(57). Bien qu'ils y soient résistants, certains chercheurs sont parvenus à provoquer le développement du diabète de type 1 chez ces rats BBDR. Plusieurs possibilités ont été découvertes : la déplétion en lymphocytes T régulateurs, ou bien l'infection par le virus de Kilham du rat(58). Toutes ces études tentent de comprendre comment se déclenche le diabète de type 1 chez l'humain, et une des hypothèses avancées est une origine virale.

6. Autres modèles

La souris et le rat sont les deux modèles les plus emblématiques de la recherche médicale. Cependant, et bien qu'ils soient les plus utilisés, d'autres modèles sont également très prisés, certains dans des domaines plus spécifiques.

a. *Le poisson zèbre*

Il se trouve que le poisson est la 2^{ème} espèce animale la plus utilisée dans le domaine de la recherche scientifique en France. Et parmi les poissons, l'espèce la plus utilisée est le zebrafish, ou *Danio rerio* de son nom scientifique. Cet incroyable poisson présente des atouts indéniables qui en font un modèle animal de choix, d'où sa récente popularité !

Tout d'abord, au même titre que pour la souris ou le rat, c'est un animal facile d'entretien, de petite taille, et qui coûte peu cher. De plus, ils se reproduisent très rapidement (approximativement tous les 10 jours), ce qui facilite les études sur plusieurs générations. Ce sont également des animaux sociaux, vivant en groupe (nécessitant peu d'espace pour de nombreux individus). On en revient donc aux mêmes critères que précédemment.

Le poisson zèbre partage avec nous un certain nombre de gènes : 71,4% des gènes chez l'homme ont un orthologue chez le zebra fish(59).

Alors pourquoi ce poisson suscite-t-il autant d'intérêt chez nos chercheurs ?

Une des particularités du poisson zèbre, c'est son développement embryonnaire. La femelle pond des œufs qui vont se développer à l'extérieur de son corps. Il est ainsi plus aisé d'observer le développement embryonnaire ou de modifier génétiquement les futurs embryons que chez la souris. On peut injecter un morceau d'ADN directement dans l'embryon pour obtenir des individus génétiquement modifiés, ce qui est beaucoup plus complexe chez la souris ou le rat. Un autre avantage, et pas des moindres, c'est que ces embryons sont translucides et permettent d'observer les différents stades de développement sans avoir à les disséquer. C'est un atout de taille dans les études de développement embryonnaire. Il est même possible de rendre ce petit poisson transparent à l'âge adulte, en le modifiant génétiquement dès sa naissance.

La facilité avec laquelle cette espèce peut être modifiée génétiquement la rend intéressante pour tous les domaines de la recherche, puisqu'on peut ainsi étudier les mutations d'un gène, provoquer certaines pathologies, etc.

Une des récentes découvertes sur ce poisson a montré qu'il peut régénérer sa moelle épinière grâce au facteur de croissance *cgtfa(60)*, également présent chez l'homme. Des études plus poussées sur le fonctionnement de ce facteur de croissance pourraient donner lieu à de nouvelles thérapies dans ce domaine.

Le poisson zèbre est une espèce étonnante qui pourrait s'avérer être la source de nombreuses découvertes à l'avenir. Toutefois, elle a ses limites et certaines pathologies humaines ne peuvent être reproduites chez le poisson zèbre : notamment des pathologies touchant des organes que n'a pas le poisson (les poumons par exemple !), ou bien des gènes dont il ne dispose pas.

b. La drosophile

On ne pouvait pas parler de modèles animaux sans présenter ce célèbre insecte ! Popularisé par le biologiste Thomas Morgan dans les années 1910, cette petite mouche a grandement contribué à l'avancée de la génétique. Morgan tentait de

démontrer les principes de la génétique établis par Mendel sur des petits pois. Pour cela, il avait besoin d'un animal facile à élever, et dont la reproduction était rapide pour l'étude sur plusieurs générations.

A l'époque, plusieurs chercheurs utilisaient déjà la drosophile pour leurs recherches, c'est le cas de Charles Woodworth qui fut le premier à l'utiliser en tant qu'organisme modèle. Plus tard, un autre biologiste travaillant sur la drosophile, Frank Lutz, en parla à Thomas Morgan qui l'adopta pour ses travaux car elle présentait tous les avantages recherchés(61). En étudiant ce petit animal, Morgan s'est rendu compte que dans la multiple descendance de la drosophile aux yeux rouges, il y avait un mutant avec des yeux blancs. Croisant alors un individu aux yeux blancs avec un aux yeux rouges, il remarqua que la descendance avait exclusivement des yeux rouges : il en conclut alors que le trait « yeux rouges » est prédominant sur le trait « yeux blancs ». C'est l'explication de caractères dominants et récessifs en génétique, ce que Mendel avait déjà observé sur des petits pois. Il venait de démontrer que ce mécanisme ne se limitait pas au monde végétal. Thomas Morgan fut récompensé pour ses découvertes sur l'hérédité par un prix Nobel en 1933.

Aujourd'hui, la drosophile est un modèle animal phare dans le domaine de la génétique, mais pas que ! Elle présente elle aussi de nombreux avantages.

D'abord, sa petite taille et sa rapidité de reproduction en font un allié lors d'études sur la reproduction : en un an, il est possible d'étudier 25 générations successives de drosophiles, là où c'est impensable pour l'humain ou d'autres espèces animales.

Son autre intérêt se situe au cœur de ses cellules. Son génome n'est représenté que par 4 paires de chromosomes. On peut modifier son ADN et en observer les conséquences avec une plus grande facilité que sur des organismes plus complexes. Son génome a été entièrement séquencé dans les années 2000 et il est environ 20 fois moins grand que le nôtre (13000 gènes pour 165 Mb)(62).

En réalité, il existe de multiples espèces de drosophiles. Celle dont nous avons précédemment parlé et que la plupart utilise, est *Drosophila melanogaster*. Mais on dénombre beaucoup d'autres espèces de drosophile. Les chercheurs s'intéressent aussi à ces autres espèces, afin de voir quelles différences il existe entre elles, en

termes de comportement, de reproduction. Il y a en fait une grande variété de comportement, de reproduction, de phénotype, chez les drosophiles. Étudier ces différences, découvrir leurs origines, retracer leur évolution, pourrait nous en apprendre davantage sur le monde du vivant.

c. Les primates non humains

Pour commencer, je vais effectuer un rappel sur la classification des primates. Cette classification est en constante évolution et fait toujours l'objet de débat. L'idée ici est de représenter de manière très succincte et non exhaustive la classification des primates et de situer l'espèce humaine. L'espèce *Homo sapiens* fait partie de la famille des hominidés, aux côtés des orang-outan, des gorilles, et des chimpanzés.

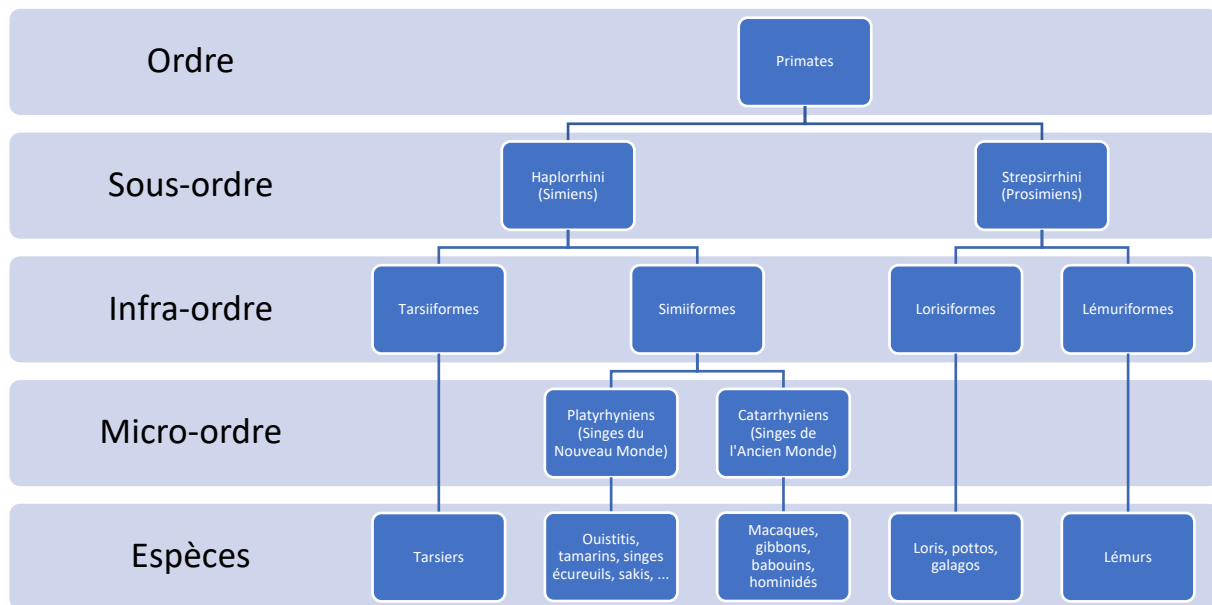


Figure 16 Classification des primates

Les primates sont les mammifères les plus proches de nous d'un point de vue phylogénétique, et c'est encore plus vrai pour les Singes de l'Ancien Monde. Nous partageons avec eux bon nombre de caractéristiques.

Le chimpanzé a été le premier primate dont le génome a été séquencé après celui de l'homme, de la souris et du rat. Il a été séquencé et comparé à celui de l'homme en

2005(63). 98% du génome du chimpanzé est identique à celui de l'homme (98% d'homologie de séquence), donc le travail de ces chercheurs s'est plus focalisé sur les différences qui pouvaient exister entre ces deux séquençages. Malgré une très forte proximité génétique, le chimpanzé et l'homme partagent bien des différences d'un point de vue physique, comportemental, social, etc. Ces spécificités humaines résident donc dans les 2% de différences que nous observons avec le chimpanzé, et qui semblent s'expliquer par certains gènes tels que FOXP2 (impliqué dans le développement du langage), ASPM (impliqué dans la taille du cortex cérébral), etc(64). En 2018 en France, plus de 3500 primates non humains ont été utilisés en recherche biomédicale(65). Parmi les primates non humains utilisés, on trouve notamment le macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*), le macaque rhésus (*Macaca mulatta*), le babouin (*Papio papio*), le singe vervet (*Chlorocebus sabaues*), le ouistiti (*Callithrix* spp.), le tamarin (*Saguinus oedipus*). Bien qu'ils soient les plus proches de nous, les primates ne sont pas systématiquement utilisés en tant que modèle animal. Les chercheurs y ont recours quand aucun autre modèle n'est approprié, et doivent le justifier : existence d'une voie biochimique commune avec l'homme uniquement chez cette espèce, modèle pathologique sans autre équivalence, etc. Les grands singes, ceux qui font partie de la famille des Hominidés (Orang-Outan, Chimpanzé, et Gorilles) ne sont jamais utilisés en Europe dans des procédures scientifiques (hormis dans un but de conservation des espèces ou d'observation éthologique).

Dans quels domaines utilise-t-on les primates ?

- En toxicologie : lorsqu'un médicament ou un vaccin doit être testé avant les essais cliniques, il arrive qu'on ait recours aux primates. C'est le cas lorsque le singe est le meilleur modèle animal dont on dispose pour évaluer les risques d'un essai clinique sur l'homme. Il en va de même pour les maladies infectieuses : les primates étant très proches de l'homme, leurs réactions immunitaires face à des agents infectieux le sont aussi.
- Études comportementales : au-delà de nos ressemblances morphologiques et structurelles avec les primates, ces derniers sont également très proches de nous via la palette d'émotions qu'ils ressentent.
- Recherche sur les pathologies neurodégénératives : les primates reproduisent de nombreux symptômes de la maladie de Parkinson qu'on peut observer chez

l'homme, contrairement aux autres modèles animaux. Grâce à cela, une thérapie génique visant à « recréer » une production de dopamine chez l'animal malade a été testée pour la première fois en France en 2009(66). Dans les maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer ou Parkinson, seul le modèle primate présente un tableau clinique aussi similaire à l'homme. D'autres modèles murins sont utilisés et sont un premier pas dans la recherche des maladies neurodégénératives, mais elles ne restituent pas une telle similarité avec les observations faites chez l'homme.

→ Recherche sur les pathologies infectieuses : l'étude du virus d'immunodéficience simienne a permis d'en apprendre plus largement sur le VIH. Le VIS est similaire à 85% avec le VIH de type 1 et produit un syndrome d'immunodéficience chez le macaque par exemple. Les scientifiques ont découvert que de nombreux traitements efficaces sur le VIS l'étaient également sur le VIH. En outre, le chimpanzé est la seule espèce animale pour laquelle on dispose de cas documenté d'infection par le VIH provoquant un syndrome d'immunodéficience(67), bien que ces cas soient très rares. Étudier le fonctionnement du VIS a permis d'en apprendre plus sur les lentivirus, et également sur les mécanismes de résistance du VIH.

Les primates non humains ne représentent qu'un infime pourcentage des animaux utilisés en recherche médicale (0,18% en 2021(21)), et ce, pour des raisons éthiques mais aussi économiques. L'utilisation de singes est coûteuse et fortement réglementée :

- Le chercheur doit détenir un certificat de capacité spécifique des primates non humains, l'autorisant à héberger les animaux (sauf si son expérimentation ne nécessite pas d'héberger les primates, mais c'est rarement le cas), ainsi qu'une autorisation d'expérimenter (ou éventuellement travailler sous la responsabilité d'une personne ayant cette autorisation). Ces certificats ont pour objectif de garantir que l'équipe saura gérer l'hébergement de l'espèce animale en question et son bien-être.
- L'établissement où auront lieu les recherches doit obtenir un agrément provenant du préfet du département : dans la demande d'agrément, doivent

être précisées les qualifications des personnes en charge de cette étude et les installations destinées aux animaux.

- L'établissement doit obligatoirement tenir des registres concernant la santé de chaque animal qu'elle héberge, de façon quotidienne, sans espace entre chaque annotation.
- Enfin, la provenance des animaux est elle-aussi réglementée. Les primates non humains doivent provenir d'un élevage agréé et spécialisé dans la fourniture d'animaux à des fins d'expérimentation animale. Il peut y avoir des exceptions, étudiées au cas par cas, mais toujours si cela est scientifiquement justifié et qu'il n'existe aucun autre moyen approprié. Si l'animal provient de l'étranger, il doit provenir obligatoirement d'un pays figurant sur la liste des pays autorisés pour l'importation de primate, provenir d'un établissement agréé par les autorités du pays en question, être identifié, et être transporté selon la réglementation en vigueur (pas de contact avec d'autres animaux notamment). Nous ne rentrerons pas dans les détails, mais l'importation de PNHs nécessite bien d'autres obligations, dont un permis d'importation et un permis d'exportation, un certificat sanitaire d'importation et de transit, etc.

L'utilisation de primates non humain est donc très stricte en France, mais permet d'une part de limiter son utilisation, et d'autre part de garantir le bien-être animal.

III. La recherche médicale

1. Plusieurs types de recherche

La recherche médicale se divise en deux grands groupes et un autre plus récent que nous allons voir. Ces différents types de recherche n'ont pas les mêmes objectifs et fonctionnent différemment.

a. *Recherche fondamentale*

Elle vise l'acquisition de connaissances fondamentales sur des mécanismes physiologiques. Elle ne se limite pas à une application en médecine et n'effectue pas

ses recherches dans un but thérapeutique. Le seul objectif de la recherche fondamentale, c'est d'apprendre.

Ainsi, ce type de recherche se révèle extrêmement vaste. Il arrive que des découvertes dans un domaine plutôt éloigné de la médecine servent finalement à celle-ci. Cela a été le cas lors de la découverte de la résonance magnétique par *Isidor Isaac Rabi* en 1938 : un phénomène physique sans application dans le domaine médical a priori. Mais cette découverte, qui a fait l'objet d'un prix Nobel de Physique, a fait naître à son tour plus de 60 ans plus tard, une idée de génie chez *Paul Lauterbur* et *Sir Peter Mansfield* qui ont développé l'imagerie par résonance magnétique : l'IRM, aujourd'hui incontournable en imagerie médicale. Et ce n'est qu'un exemple parmi beaucoup d'autres.

Parlons maintenant des organismes pratiquant cette recherche fondamentale. Celle-ci est souvent menée par des organismes publics tels que le CNRS, les laboratoires universitaires, etc... L'INSERM fait aussi de la recherche fondamentale, mais principalement de la recherche appliquée qui représente 60% de ses publications(68). La recherche fondamentale nécessite des moyens mais n'est pas particulièrement rentable d'un point de vue financier. Une découverte n'aboutit pas toujours à une application médicale qui puisse être commercialisée, une entreprise qui financerait uniquement de la recherche fondamentale ne serait pas viable. C'est pour cette raison que le financement de ce type de recherche est majoritairement organisé par l'État, notamment via les organismes cités plus haut. Cela ne signifie pas pour autant que l'argent utilisé à ces fins scientifiques provienne uniquement des caisses de l'État : ces organismes ont recours à la fois à des fonds publics mais également à des fonds privés (donateurs privés, associations de recherche, partenariats publics-privés, etc.). Il y a néanmoins des organismes privés comme des laboratoires pharmaceutiques qui font de la recherche fondamentale, mais généralement sur le fonctionnement d'une pathologie en particulier, dans l'espoir de mieux comprendre cette pathologie et de développer des thérapies.

On l'aura compris, le principe de la recherche fondamentale est donc d'accroître nos connaissances de manière globale pour qu'en ressortent des concepts nouveaux. Elle est source d'outils innovants et élargit notre champ de vision. Le second type de

recherche dont nous allons parler découle de la recherche fondamentale : il s'agit de la recherche appliquée.

Avant de poursuivre, nous pouvons d'ores et déjà poser une question légitime : l'utilisation d'animaux en recherche fondamentale est-elle justifiée ? En effet, puisque ce type de recherche n'a pas d'application précise et ne mène pas nécessairement au développement d'un traitement ou d'un outil diagnostique, on peut s'interroger. Mais pouvons-nous réellement nous passer de la recherche fondamentale ? Est-il possible de se passer d'animaux pour observer des mécanismes physiologiques ? Je traiterai ces questions dans la partie éthique.

b. Recherche appliquée

La recherche clinique, également appelée « recherche appliquée », constitue la suite logique de la recherche fondamentale. Elle se base sur les publications de la première pour trouver des solutions pratiques, appliquées à un problème bien particulier. En effet, elle a un but précis, celui de trouver un remède à une pathologie, une méthode de diagnostic performante, un moyen de prévention face à une maladie, ... L'objectif est donc d'aboutir à la production d'un médicament en règle générale, ou d'un dispositif médical, ou encore d'un nouveau moyen diagnostique comme évoqué plus haut.

Elle intervient depuis la détermination de la cause d'une pathologie jusqu'à l'élaboration d'un traitement et la mise en place d'essais cliniques. Elle se distingue de la recherche fondamentale principalement par son objectif. Cependant, sans recherche fondamentale pour donner une base solide à des idées de traitement, il serait difficile de concevoir la recherche appliquée. Comment éradiquer une pathologie par exemple du foie quand on ne sait même pas comment cet organe fonctionne ? Comment savoir si un traitement sera efficace et sans risque quand on ne connaît pas les cibles sur lesquelles il agit ? Ou encore, tout simplement, comment comprendre un processus pathologique sans connaître au préalable le processus

physiologique ? Ces deux types de recherches sont intimement liés, et la limite entre les deux peut parfois être floue.

Le domaine de l'immunologie cellulaire en est un très bon exemple. C'est une meilleure compréhension de notre système immunitaire qui a permis d'aboutir aujourd'hui, au développement d'un nouveau type de thérapie innovante : l'immunothérapie. La découverte de la structure chimique des anticorps par *Gerald M. Edelman* et *Rodney R. Porter*, qui leur a valu un Prix Nobel en 1972, est le fruit de la recherche fondamentale. C'est en se basant sur ces découvertes, et bien d'autres qui ont suivi, qu'aujourd'hui ont été développés des CAR T-cells : des lymphocytes d'un patient reprogrammés pour éliminer des cellules tumorales. Ce type de thérapie a été une avancée majeure dans la Leucémie Aigue Lymphoblastique notamment.

De même, la thérapie génique n'aurait sans doute jamais pu voir le jour sans la découverte de la structure de l'ADN par *Watson* et *Crick*. Encore un autre exemple de la coopération entre recherche fondamentale et recherche appliquée.

Pour résumer, la recherche clinique se concentre principalement sur le versant pathologique et sur l'élaboration d'un traitement. Elle s'appuie sur de nombreuses données issues de la recherche fondamentale et formule une hypothèse thérapeutique. A partir de mécanismes pathologiques identifiés, elle développe et teste une idée de traitement. C'est elle qui va mettre en place les essais cliniques (dont nous parlerons plus en détails plus tard) sur l'homme.

Comment est organisée cette recherche clinique ?

Tout d'abord, ce type de recherche peut être financée autant par des organismes publics que par des laboratoires pharmaceutiques. Néanmoins, l'industrie pharmaceutique représente une part importante de la recherche clinique, puisque c'est elle qui va, à terme, développer et commercialiser le médicament. Les essais cliniques se font généralement à l'Hôpital (lieu de recrutement des patients) et sont toujours réalisés sous le contrôle d'un ou plusieurs médecins investigateurs. Le promoteur, celui qui finance l'essai clinique, peut donc être un laboratoire pharmaceutique, mais également une association comme le Sidaction.

On parle de recherche clinique « industrielle » lorsque le promoteur principal est une industrie pharmaceutique, et de recherche clinique « institutionnelle » lorsque celui-ci est représenté par l'État ou par des associations.

2. Étapes de développement d'un médicament

Le développement d'un médicament prend en moyenne 15 ans et coûte des sommes astronomiques (environ 900 millions de dollars pour mettre au point un médicament(69)). Cela comprend la découverte d'une molécule potentiellement thérapeutique (qu'on appelle candidat) jusqu'à la mise sur le marché de ce nouveau médicament et sa surveillance.

Le médicament va donc passer par de nombreux tests afin de vérifier son efficacité, mais aussi sa sécurité. Tous ces éléments seront consignés dans un dossier qui sera évalué par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament. Cette agence est un organisme d'État indépendant de tout laboratoire pharmaceutique.

Je vais développer ici toutes ces étapes, une à une.

51 DE L'IDÉE AU PRODUIT : GENÈSE D'UN MÉDICAMENT

Source : Leem

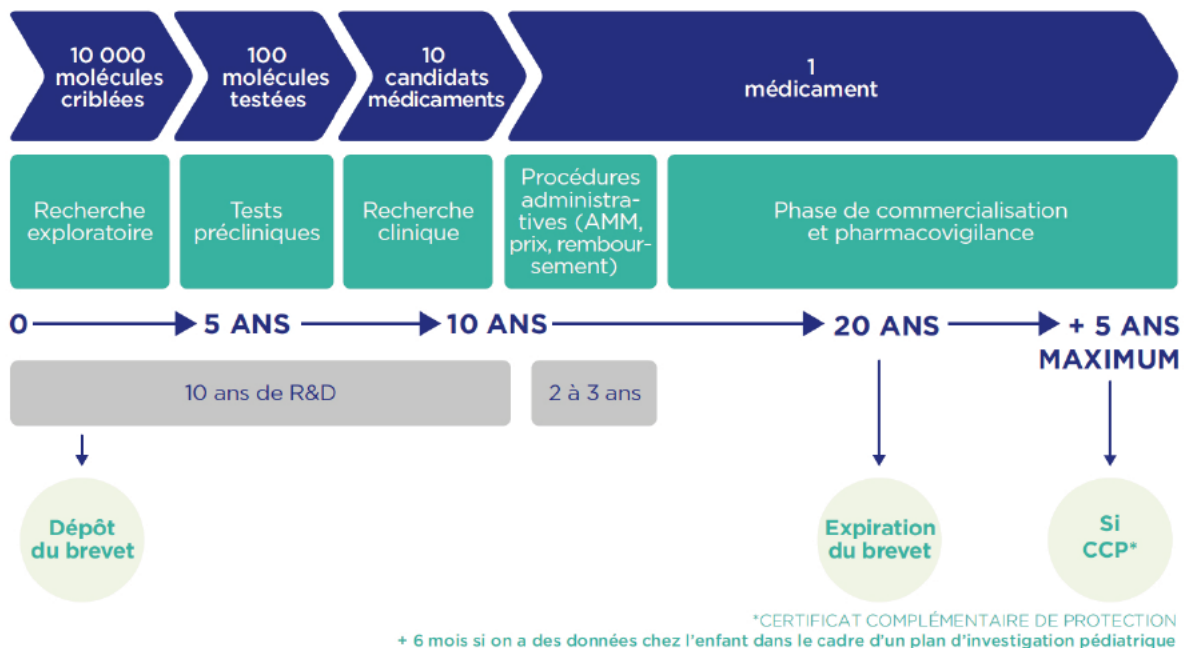


Figure 17 Les étapes du développement d'un médicament - Les Entreprises du Médicament

a. Phase préclinique

Avant d'envisager la conception d'un médicament, des milliers de molécules sont testées en recherche appliquée afin de déceler un éventuel pouvoir thérapeutique. Parmi ces milliers de molécules, seules quelques-unes seront retenues pour faire l'objet d'études plus poussées afin d'explorer leur potentiel thérapeutique et aboutir à leur mise sur le marché si elles sont sûres et efficace(70). C'est ce qu'on appelle des « candidats médicaments ».

La première étape consiste en la phase pré-clinique : il s'agit d'apprendre le comportement d'une molécule d'abord *in vitro* (à l'échelle cellulaire), puis dans un organisme vivant complet *in vivo* (dans des modèles animaux), avant de passer aux essais sur l'homme. La phase pré-clinique a pour rôle de garantir autant que possible la sécurité de l'homme lorsque le candidat médicament passera aux étapes suivantes. Cette phase pré-clinique permet de :

- Comprendre le mécanisme d'action cellulaire d'une molécule (sur quel type de cellule il agit, sur quel récepteur, ...)
- Voir si la molécule présente d'autres cellules cibles que celles testées au départ (permet de déceler d'éventuels effets secondaires)
- Déterminer sa pharmacocinétique : sa vitesse d'absorption selon les différentes voies d'administration, sa métabolisation, son élimination. Ce n'est qu'en connaissant la vitesse d'absorption et la vitesse d'élimination que l'on pourra estimer la dose à tester chez l'animal puis chez l'homme. Sans ces données pharmacocinétiques, on ne peut pas savoir à quelle dose le produit expérimental aura la meilleure balance bénéfices/risques.
- Définir son profil toxicologique : organes cibles, dose toxique chez l'animal, éventuels effets secondaires. Lorsqu'on définit le profil toxicologique, on va déterminer plusieurs points :

L'utilisation d'animaux lors de ces procédés coûte cher à l'industrie pharmaceutique, car cela nécessite de nombreux animaux, du personnel qualifié, des études longues.

C'est pourquoi elle n'engage ces études que lorsque le candidat médicament a un fort potentiel, et préférera avoir recours à des méthodes alternatives lorsque c'est possible, car ces dernières sont moins coûteuses (culture cellulaire, modélisation informatique, etc.). L'utilisation de méthodes *in vitro* et *in vivo* sont complémentaires : l'apport de connaissances par des études *in vitro* permettent de mieux orienter les expériences *in vivo*, et ainsi, d'y avoir moins recours.

b. Phase I

Parmi plusieurs dizaines de candidat médicaments en phase pré-clinique, seule une dizaine passe à l'étape suivante : les essais cliniques chez l'homme. Pour que l'industrie pharmaceutique soit autorisée à tester le candidat médicament pendant des essais cliniques, elle doit recevoir un avis favorable du Comité de Protection des Personnes et de l'ANSM qui vont étudier tous les éléments cités ci-dessus et évaluer la balance bénéfice/risque d'un essai clinique. Ces essais cliniques se situent en amont de la commercialisation du médicament et permettent d'évaluer sa tolérance et son efficacité sur l'homme.

Tout d'abord, la phase I permet d'évaluer la toxicité du produit expérimental chez l'homme. Pour cela, il est administré à des volontaires sains (une vingtaine de personnes en général), ou plus rarement malades. On part d'une dose très faible en s'appuyant sur les données collectées pendant la phase préclinique et on augmente petit à petit les doses. Cela permet de déterminer la dose maximale tolérée.

Durant cette phase, il sera vérifié que la molécule agit bien sur les organes cibles prévus, et qu'il n'y a donc pas d'effets secondaires majeurs. Les données pharmacocinétiques préalablement observées chez l'animal pourront donc, à ce stade, être vérifiées chez l'homme. Les volontaires seront sous contrôle médical strict pendant toute la durée de l'étude, qui est souvent plus courte que pour les autres étapes. Le profil pharmacocinétique de la molécule pourra également être observé afin de voir s'il est cohérent avec les données précliniques.

A la fin de cette phase I, si la molécule montre un bon profil de tolérance (pas d'effet indésirable majeur aux doses utilisées), elle pourra demander une autorisation pour

passer aux essais de phase II. L'objet de cette phase I est aussi de déterminer à quelle dose et sur quelle fréquence d'administration les investigateurs doivent se baser pour la suite des essais cliniques.

c. Phase II

Cette phase concerne un plus grand groupe de volontaires, cette fois-ci malades (quelques centaines de volontaires sont en général admis). L'intérêt de cette phase est de démontrer le pouvoir thérapeutique de la molécule et de déterminer la posologie adaptée à cet effet.

Pour y parvenir, la phase II est divisée en deux étapes :

- La première consiste à évaluer la dose minimale efficace, dose pour laquelle le patient présente le moins d'effets secondaires. Cette étape concerne en général une centaine de patients.
- Ensuite, cette dose est administrée à un plus grand nombre de patient (200 ou 300 pour optimiser la posologie et observer les effets thérapeutiques.

d. Phase III

La phase III est la suite logique de la phase II : il s'agit de confirmer l'efficacité de la molécule mais sur un bien plus grand nombre de patients (recrutés en France et à l'étranger). Le fait d'avoir un très grand nombre de patient va permettre de confirmer la dose thérapeutique optimale, d'observer des effets indésirables moins fréquents qui auraient pu échapper aux chercheurs lors de la phase II, et donc de confirmer l'effet thérapeutique du médicament. Dans ce but, il est possible de réaliser deux groupes et de comparer l'effet thérapeutique chez le groupe traité par rapport à un groupe ayant reçu un placebo. Il arrive également que l'on compare à un groupe recevant un traitement conventionnel (afin de voir si la molécule expérimentée est plus efficace que les médicaments déjà présents sur le marché). Lorsqu'on réalise deux groupes de patients (traité versus placebo), il est primordial que ni le personnel soignant ni le patient ne sache ce qu'il prend pour éviter « l'effet placebo ». Les données sont collectées anonymement grâce à un numéro d'identification.

Pour compiler le plus de données possibles lors de cette phase, les données de différents centres d'investigation en France et ailleurs sont collectées et rassemblées pour procéder à des analyses statistiques. Ce sont ces analyses qui vont prouver l'efficacité du traitement et sa sûreté.

Si toutes ces données sont favorables, l'industrie pharmaceutique constitue le dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) auprès de l'ANSM. Cette agence donnera ensuite son accord pour la commercialisation du médicament, ou non. Si elle n'est pas satisfaite par le dossier, elle peut demander des investigations complémentaires. L'évaluation par l'ANSM du dossier AMM peut mettre entre 1 et 3 ans, et comprend également des négociations concernant le prix de vente du médicament avec l'industriel.

e. Phase IV

Malgré l'autorisation de mise sur le marché, ce n'est pas fini ! En effet, il persiste une surveillance après la commercialisation du médicament afin de détecter tous les effets secondaires possibles. Il arrive que l'on ne découvre des effets secondaires extrêmement rares qu'après la mise sur le marché (car le nombre de patients utilisateurs est très grand comparé aux essais cliniques). L'ANSM met donc en place une surveillance post-AMM pour continuer l'évaluation de la sûreté du médicament et retirer son AMM si cela est justifié. C'est ce qu'on appelle la pharmacovigilance.

Au total, pour un médicament commercialisé, on estime à 100 le nombre de candidats en phase préclinique(70). Cela représente une perte non négligeable pour l'industrie pharmaceutique qui engage des sommes importantes dans plusieurs médicaments candidats qui n'aboutissent pas à la mise sur le marché.

Le développement d'un seul médicament prend donc énormément d'années mais toutes ces étapes sont nécessaires pour garantir la sécurité du patient. A l'heure où la société est de plus en plus intransigeante en matière de santé, les chercheurs et les industriels doivent prouver la sûreté de leurs médicaments, et cela passe

obligatoirement par l'utilisation de modèles animaux. Comme nous l'avons vu plus haut, toutes les données acquises par les essais précliniques, puis par les essais cliniques, ne visent pas à *affirmer* que le médicament ne présente aucun danger. Elles sont là pour réduire le risque autant que possible, tout en permettant aux patients de bénéficier de nouveaux traitements.

3. L'utilisation des animaux pendant la phase préclinique

C'est pendant cette phase préclinique du développement d'un médicament que l'animal est utilisé pour garantir la sécurité des phases suivantes destinées à l'humain. Afin de garantir une sécurité maximale de l'utilisation du médicament tout en limitant le nombre d'animaux utilisés pour ces tests, des guides de recommandations ont été établis par l'International Council of Harmonisation (ICH). Ces guides donnent des lignes directrices pour chaque étape du développement pré-clinique : espèce utilisée, dose sélectionnée, protocoles limitant le nombre d'animaux, etc. Tout cela permet *in fine* d'optimiser les procédures dans le but d'avoir des résultats fiables en utilisant un minimum d'animaux.

Ces recommandations ont une portée internationale, mais ne sont pas obligatoires. Cependant, la plupart des industriels les respectent car les autorités de santé des différents pays se basent sur ces recommandations pour autoriser la mise sur le marché des médicaments. Tout écart devra être scientifiquement justifié, sous peine de devoir reconstituer un dossier et de recommencer certaines parties de l'étude. Par ailleurs, cette harmonisation a un autre intérêt : elle « centralise » les exigences de tous ces pays. Ainsi, un même dossier peut être validé dans différents pays (puisque les recommandations sont internationales) sans qu'il soit nécessaire de procéder à de nouvelles expérimentations.

« Les lignes directrices sont des documents destinés à guider l'industrie et les professionnels de la santé sur la façon de se conformer aux politiques et aux lois et règlements qui régissent leurs activités. Elles servent également de guide au personnel lors de l'évaluation et de la vérification de la conformité et permettent ainsi

d'appliquer les mandats d'une façon équitable, uniforme et efficace. » ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use

Nous allons détailler les différentes étapes de la phase préclinique selon les recommandations de l'ICH.

a. Étude du potentiel cancérigène

L'étude du potentiel cancérigène d'une substance est bien évidemment essentielle avant de passer aux essais cliniques chez l'homme, et avant une mise sur le marché, notamment lorsque le médicament étudié vise à être administré de façon continue sur une grande période. Les lignes directrices de l'ICH émettent des recommandations quant aux situations qui nécessitent des études de carcinogénicité. Ces études sont requises :

- Lorsque le médicament est « supposé être administré en continu et sur une durée de plus de 6 mois » ou « pour ceux dont la période est plus courte mais utilisés fréquemment de façon intermittente, pour le traitement de troubles chroniques ou récurrents ». C'est le cas par exemple de traitement pour la migraine, ou d'antalgiques. En revanche, un anesthésique qui ne sera utilisé que ponctuellement n'aura pas besoin de recourir à des études de carcinogénicité (sauf si une autre raison le justifie).
- Lorsque le médicament suscite une inquiétude particulière : quand les précédentes études de toxicité montrent un éventuel potentiel cancérigène, ou que la relation structure-activité de la molécule laisse à penser qu'elle pourrait être cancérigène, ou bien une rétention tissulaire à long terme qui augmenterait le risque de cancer.
- Lorsque des substances d'essais montrent un potentiel génotoxique, que ça soit lors d'études antérieures d'une même molécule ou bien lors d'étude de toxicité, elles sont automatiquement présumées carcinogènes et ne nécessitent alors pas d'étude de carcinogénicité à long terme.
- Lorsqu'un produit topique montre une exposition systémique.

En dehors des cas cités plus haut, il y a des situations où les études de cancérogénicité ne sont pas forcément requises (hors justification scientifique) : lorsque la substance d'essai est une substance endogène, c'est-à-dire une substance naturellement produite par le corps humain (mais servant dans ce cas précis à des thérapies de remplacement, par exemple l'insuline ou les hormones de croissance).

Sachant que les résultats obtenus sur les animaux ne sont pas toujours transposables à l'homme, des études supplémentaires peuvent être menées afin d'approfondir les observations faites chez l'animal, et d'en détailler les mécanismes.

Une fois établie la nécessité ou non de pratiquer ces études de cancérogénicité, l'ICH recommande de disposer des résultats d'études préalables avant de commencer les études de cancérogénicité : résultats des études de génotoxicité, propriétés pharmacodynamiques de la substance chez les animaux et chez les humains, et des résultats des études de toxicologie à doses répétées. Ces informations permettront de mieux définir les tests pour l'étude du potentiel cancérogène. Par exemple, la connaissance de la dose provoquant un effet toxique, ou de la relation dose-effet, va permettre de définir des niveaux de doses pour les études de cancérogénicité. Réaliser les études de génotoxicité en amont permet de s'affranchir des études de cancérogénicité à long terme si le composé s'avère être génotoxique. Tout cela permet un gain de temps, d'argent, et de vie animale.

Maintenant que nous avons vu les situations qui nécessitent des études de cancérogénicité, et les prérequis pour lancer ces études, nous allons voir comment celles-ci s'effectuent. L'ICH propose un plan de base qui pourra être modulé au besoin selon les substances d'essai et les résultats qui précèdent les études de cancérogénicité (sur justification scientifique). L'ICH s'est inspiré de travaux menés par différentes institutions du monde entier (Centre international de recherche sur le cancer, Food and Drug Administration, etc.) afin de recommander des méthodes permettant « d'évaluer le potentiel cancérogène de produits pharmaceutiques sans qu'il soit nécessaire d'en étudier les propriétés cancérogènes chez deux espèces de

rongeurs comme on l'a toujours fait jusqu'ici. ». Ainsi, ces nouvelles recommandations permettent d'actualiser les connaissances à ce sujet et de réduire les vies animales utilisées à cette fin. Le choix final revient à l'industriel mais celui-ci doit être justifié scientifiquement et étayé par des documents.

Le plan de base prévoit donc :

- Une étude de la cancérogénicité à long terme chez un rongeur
- Une autre épreuve de cancérogénicité *in vivo* :
 - o Une évaluation *in vivo* à moyen ou à court terme chez un rongeur
 - o Ou une étude à long terme du processus cancérogène chez une deuxième espèce de rongeur

Concernant l'espèce utilisée, l'ICH recommande d'utiliser le rat sauf si d'autres éléments scientifiques orientent vers une autre espèce qui serait plus adaptée (en raison du mécanisme d'action du médicament, de ses récepteurs cibles, de son métabolisme, etc.).

b. Étude de génotoxicité

La génotoxicité est définie comme « la capacité d'une substance ou d'un rayonnement à altérer le génome d'êtres vivants »(71). En effet, certaines molécules peuvent altérer l'ADN des cellules des êtres vivants. Ce faisant, elles sont à l'origine de mutations pouvant engendrer diverses pathologies (notamment des cancers). Ces altérations de l'ADN peuvent se transmettre à la descendance si elles surviennent au niveau des organes reproducteurs. Il y a un lien étroit entre génotoxique et cancérogène : l'altération de l'ADN est une étape préliminaire au développement d'un cancer, mais un produit génotoxique n'induit pas toujours de cancers ni n'augmente systématiquement sa fréquence.

Il est primordial de détecter le potentiel génotoxique d'une substance avant de passer aux essais cliniques sur l'homme, car ses effets peuvent se révéler catastrophiques et irrémédiables.

L'ICH définit l'évaluation de la toxicité « comme un ensemble d'épreuves *in vitro* et *in vivo* par lesquelles il est possible de détecter les composés qui induisent des lésions génétiques par l'intermédiaire de divers mécanismes ». Pour la mettre en évidence, il

est recommandé de réaliser une batterie d'épreuves normalisés. Deux options principales sont mises en avant.

Option 1 :

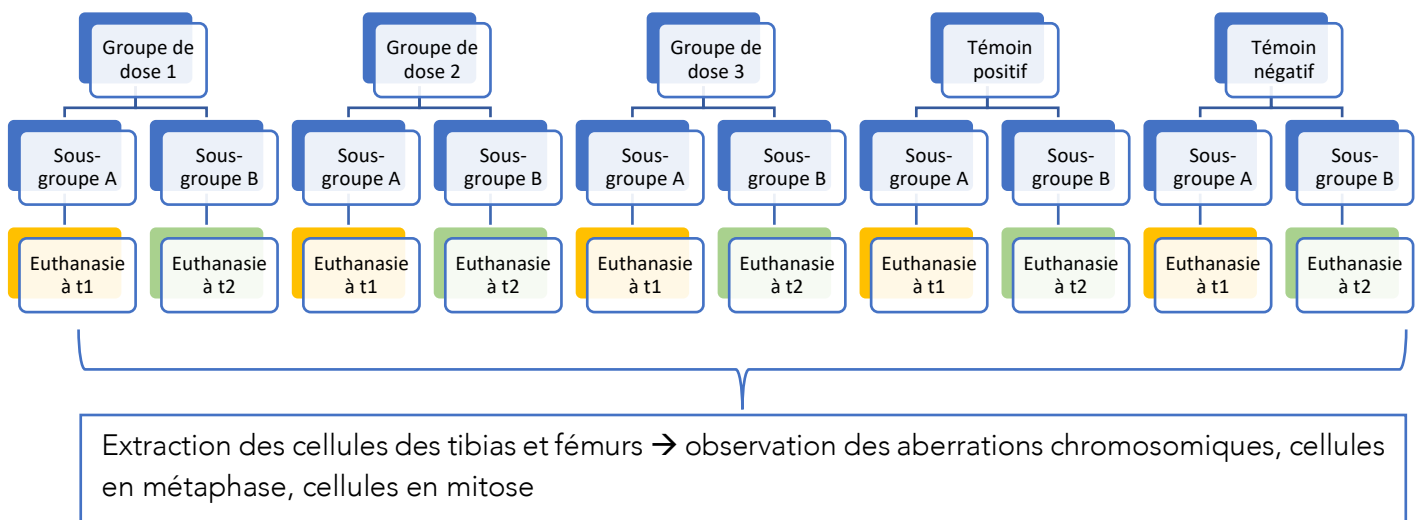
- **Une épreuve bactérienne mettant en évidence les mutations géniques** : c'est ce qu'on appelle *l'essai de mutation réverse sur des bactéries* ou épreuve d'Ames (test décrit par l'OCDE). Le principe étant d'exposer des bactéries bien spécifiques à notre substance d'essai et d'observer les modifications génétiques qui surviennent chez elles. L'avantage de cette méthode repose sur la détection spécifique des mutagènes : chaque souche est spécifique d'un type de mutation. Un résultat positif apportera aussi des informations sur le mécanisme d'action de l'agent génotoxique. Cette épreuve a montré qu'elle détectait les modifications génétiques pertinentes et la majeure partie des cancérogènes génotoxiques chez les rongeurs et les humains(72). Pour détecter la génotoxicité, il n'est donc pas toujours nécessaire de recourir à des tests impliquant des animaux. Lorsque le résultat n'est pas aussi net ou que le test n'est pas adéquat pour la substance d'essai, le recours à d'autres tests ne peut être évité.
- **Une épreuve cytogénétique mettant en évidence les lésions chromosomiques *in vitro* ou une épreuve de mutation génique *in vitro* sur les cellules de lymphome murin à gène tk.** Différents tests sont alors possibles : test d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères, essai *in vitro* de micronoyau sur cellules de mammifères, essai *in vitro* de mutation génique sur cellules de mammifères utilisant le gène de la thymidine kinase. Toutes ces expérimentations utilisent des lignées cellulaires humaines ou provenant d'autres mammifères mais n'ont pas directement recours à des animaux vivants. En réalité, on peut soit utiliser des lignées cellulaires immortalisées (ce sont des cellules prélevées sur des animaux ou chez l'homme et qu'on a rendu immortelle par l'ajout de certains gènes autorisant une multiplication quasi-infinie, des stocks de ces cellules peuvent être conservés et multipliés), soit utiliser des cellules primaires (cellules provenant directement d'organismes vivants par prélèvement, aussi bien chez l'animal que chez l'homme). Les cellules primaires sont plus proches de l'homme – d'autant plus si elles sont

humaines ! – puisqu’elles n’ont pas été génétiquement modifiées, mais elles sont plus coûteuses et leur prélèvement, qu’il soit fait chez l’homme ou l’animal, demande de respecter des fondamentaux éthiques. Le principe de ces différentes épreuves est d’exposer la culture cellulaire à notre substance d’essai et d’en observer les effets à l’échelle cellulaire. La pertinence des résultats obtenus va dépendre de nombreux paramètres comme les conditions réunies lors de l’expérimentation, les critères de reproductibilité dans le milieu vivant, etc. Dans tous les cas, ces tests apporteront des informations utiles sur la substance.

- **Une épreuve *in vivo* pour détecter la génotoxicité** : en général, deux tests sont utilisés, l’essai d’aberration chromosomique sur moelle osseuse de mammifères, ou le test du micronoyau sur érythrocytes de mammifères.
 - o *Essai d’aberration chromosomique sur moelle osseuse de mammifères* : les animaux sont exposés à la substance d’essai par une voie d’exposition cohérente (qui correspond à la voie envisagée pour l’homme) pendant une durée déterminée et seront euthanasiés au moment approprié afin de prélever les cellules de la moelle osseuse et observer les cellules en métaphase (permettant ainsi de voir s’il y a des aberrations chromosomiques). L’espèce animale généralement utilisée est le rat (sauf indication spécifique pour une autre espèce). Le rat doit être un adulte sain d’une souche commune. On réalise pour cette expérience 3 groupes de traitement (c’est-à-dire 3 groupes de doses) comportant chacun 2 sous-groupes, 1 groupe témoin positif, et 1 groupe témoin négatif. Au total, cela représente 45 animaux (5 par groupe). Ce nombre peut varier selon les besoins, et n’est pas fixe pour une expérience donnée. On cherche ici à reproduire une administration unique chez l’animal et voir ensuite si cette exposition induit des effets génotoxiques. Pour observer des effets génotoxiques, on analyse les cellules de la moelle osseuse de l’animal pendant la métaphase (on choisit la moelle osseuse car les cellules y ont un cycle rapide, et c’est un tissu très vascularisé donc facilement « atteignable » par la substance d’essai). Pour cela, un simple prélèvement ne fournit pas une quantité suffisante de cellules pour l’analyse donc on euthanasie l’animal afin de

prélever ses fémurs et tibias et en extraire les cellules. Ces cellules sont ensuite observées pour détecter d'éventuelles aberrations chromosomiques comparativement aux cellules du groupe témoin négatif et positif. Cette étape fournira bon nombre d'informations car on va pouvoir différencier les résultats selon la dose administrée, mais aussi selon la durée d'exposition puisqu'on a deux sous-groupes euthanasiés à des moments différents.

- *Test du micronoyau sur érythrocytes de mammifères* : ce test est une épreuve supplémentaire permettant d'observer d'autres effets d'un composé génotoxique. Les mécanismes d'altération de l'ADN étant sensiblement les mêmes chez l'animal que chez l'homme, cette épreuve a démontré son intérêt dans l'étude de génotoxicité. Lorsque des cellules sont exposées à des substances génotoxiques, elles ont un taux de micronoyaux supérieur à des cellules non exposées. Ces micronoyaux



sont le témoin de lésions cytogénétiques. Le principe est quasiment le même que pour l'essai d'aberration chromosomique : on expose des animaux à la substance d'essai par une voie appropriée, puis on euthanase les animaux et on extrait la moelle osseuse pour analyser les cellules. Ici aussi, on réalise 5 groupes d'animaux (3 groupes traités, un 1

groupe témoin positif et 1 groupe témoin négatif). Cependant, contrairement à l'essai d'aberration chromosomique, ce test peut s'effectuer de plusieurs façons concernant l'administration de la substance d'essai : soit on administre le produit en une seule fois (auquel cas, on suit le même protocole que pour l'essai d'aberration chromosomique), soit on administre en 2 traitements à 24h d'intervalle (pour simuler deux prises), soit en 3 traitements ou plus à 24h d'intervalle (cette dernière modalité permet de combiner le test des comètes et le test du noyau). L'analyse peut être manuelle (observation et dénombrement des micronoyaux), ou bien automatique par un cytomètre de flux par exemple.

Option 2 :

- **Une épreuve bactérienne mettant en évidence les mutations géniques** : il s'agit ici aussi de l'essai de mutation réverse sur des bactéries (identique à celui présenté dans l'option 1). C'est donc une épreuve réalisée sur des bactéries.
- **Une évaluation de la génotoxicité *in vivo* en utilisant deux tissus différents, habituellement** :
 - o Évaluation des micronoyaux au moyen de cellules hématopoïétiques de rongeurs : il s'agit du même test que précédemment, c'est-à-dire le *test du micronoyau sur érythrocytes de mammifères*.
 - o Épreuve de fracture du brin d'ADN dans le foie : il s'agit du *test des comètes in vivo en conditions alcalines sur cellules de mammifères*. Le principe de ce test est d'exposer les animaux, habituellement des rats, à la substance d'essai, et d'ensuite prélever leurs tissus pour détecter des cassures de brins d'ADN dans leurs cellules. En exposant l'animal *in vivo* et en prélevant plusieurs tissus différents de l'animal, on obtiendra des résultats dépendant de la pharmacocinétique du médicament (chose qu'on ne peut pas reproduire *in vitro*). On extrait, à partir de ces cellules, leur ADN qu'on fait migrer sur un gel d'agarose : les brins d'ADN non fragmentés (intacts) restent dans la position initiale, alors que les fragments d'ADN qui ont été fracturés et qui sont donc plus petits vont

migrer dans le gel (et donner l'aspect de « comètes »). Une fréquence d'ADN fragmenté plus élevée dans les groupes traités comparativement au témoin négatif est un indice de génotoxicité. Comme pour les autres tests, on forme généralement 3 groupes qui seront traités à des doses différentes, ainsi qu'un groupe témoin négatif et un groupe témoins positif. Cela représente environ 35 animaux. Dans ce cas présent, les animaux sont traités chaque jour pendant 2 jours ou plus, puis les animaux sont sacrifiés 6 heures après le dernier traitement pour extraire les tissus nécessaires. Les données obtenues donnent le pourcentage d'ADN de queue (fragments d'ADN). Ce test peut tout à fait être combiné avec le test du micronoyau pour limiter le sacrifice de vies animales.

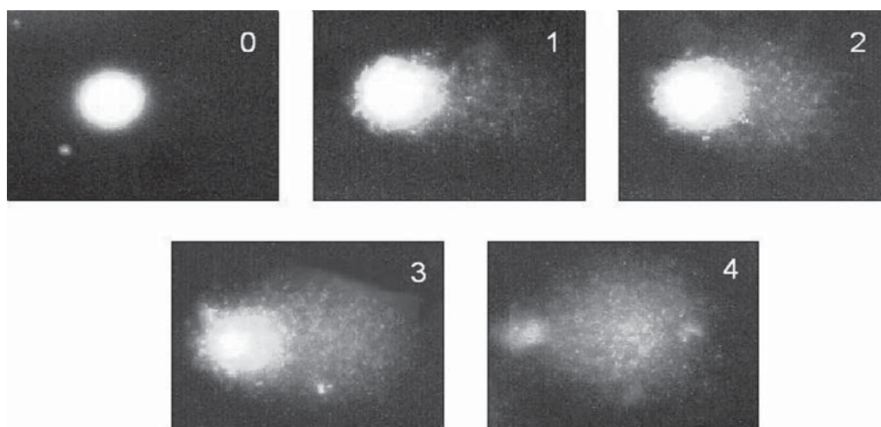


Figure 18 Exemple d'un test de comètes : classement de 0 (ADN non fragmenté) à 4 (ADN très fragmenté). Collins AR. *The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations*. Mol Biotechnol. 2004

Concernant l'espèce utilisée, il est vrai que le rat est très fréquent car c'est une espèce pour laquelle on dispose de beaucoup d'informations sur son métabolisme, son organisme, etc. Il est important d'utiliser la même espèce pour tous les tests présentés ici, afin de pouvoir mettre en corrélation les résultats obtenus. C'est pour cette raison qu'on privilégie la même espèce que celle utilisée dans les études de toxicité par exemple. Dans de rares cas, il peut s'agir d'une autre espèce, mais cela doit être justifié sur le dossier.

En règle générale, ces épreuves permettent de détecter un niveau de génotoxicité même à faible dose(73) mais un résultat positif doit toujours être interprété avec prudence, et tenir compte du nombre de cellules au moment de l'analyse.

c. Étude de toxicocinétique

La toxicocinétique a pour but de déterminer la relation entre la dose administrée et le niveau de toxicité observé. Pour cela, elle s'appuie sur plusieurs données telles que la relation dose-réponse en fonction du temps, la cinétique de la substance d'essai, etc. Ces données sont obtenues généralement en même temps que les études de toxicité pour un gain de temps et de vie animale, mais il est possible de réaliser une étude à part pour cette partie. La cinétique de la substance est obtenue dans les conditions décrites pour les études de toxicité. Les éléments de toxicocinétiques peuvent être déduits et calculés lors des études de toxicité aiguë, ou de génotoxicité, ou encore de cancérogénicité. Ces études vont apporter des informations précieuses sur l'absorption, la distribution, la métabolisation, et l'élimination de la substance d'essai mais dans des conditions bien précises. Grâce à ces études, il sera possible de savoir si le produit s'accumule dans les tissus par exemple, ou s'il donne lieu à des métabolites toxiques ou non, comment s'établit la relation entre la dose administrée et les effets toxiques observés. Il est recommandé de tenir compte des caractéristiques du produit d'essai mais aussi des différences entre les espèces utilisées et l'homme, chez qui la liaison aux protéines plasmatiques ou la fixation dans les tissus peut être différente. Ainsi, l'ICH conseille d'utiliser la concentration plasmatique libre plutôt que liée pour caractériser l'exposition à une substance d'essai qui se fixe fortement aux protéines plasmatiques.

Afin d'optimiser le temps d'étude et l'utilisation d'animaux, il est utile de s'appuyer sur les données obtenues préalablement sur la substance d'essai ou ses métabolites (provenant d'autres études, ou bien de données *in vitro* ou *in vivo*) : l'OCDE préconise de disposer notamment du coefficient de partage octanol-eau, du pKa, de l'hydrosolubilité, et du poids moléculaire du produit.

Tous les résultats obtenus serviront à appréhender la toxicité du produit, dans quelles conditions les effets toxiques sont observés et à quelle dose, s'il y a des différences de toxicité entre les groupes de doses ou de sexe. En fonction de ces données, un ajustement du schéma thérapeutique des études cliniques pourra être justifié.

L'ICH ne recommande pas de protocole spécifique et laisse l'utilisateur libre d'adapter ses études de toxicocinétique selon les besoins, puisque ces études peuvent être concomitantes à d'autres études de toxicité. Il faut néanmoins toujours justifier d'un nombre minimal d'animaux pour que les données soient pertinentes.

L'OCDE, elle, propose un protocole de toxicocinétique que le laboratoire peut suivre s'il souhaite réaliser une étude à part entière et non concomitante. Je vais la décrire ci-dessous.

Les animaux utilisés seront les mêmes que pour les études de toxicologie (afin de comparer les résultats), donc normalement il s'agit de rats âgés de 6 à 12 semaines, ayant un poids similaire (pas plus de 20% d'écart de poids). Il y aura 4 animaux de même sexe par groupe de dose testé. Il est possible d'utiliser deux sexes différents si cela s'avère justifié (et notamment si les autres études de toxicité ont également porté sur les deux sexes).

Il existe deux types d'études de toxicocinétique :

- Une étude pilote : on administre une dose orale unique qui n'est pas toxique mais qui va permettre d'identifier les métabolites de la substance d'essai dans les excréta
- Des études principales : on réalise au minimum deux groupes de doses (en-dessous de la dose létale 50) pour observer la relation dose-toxicité.

Concrètement, les animaux sont exposés à la substance d'essai généralement par voie orale selon le groupe de dose dans lequel ils sont. L'ICH recommande d'établir une dose inférieure sans effet toxique (idéalement qu'elle soit légèrement supérieure au maximum anticipé chez le patient), une dose intermédiaire qui soit un multiple de la dose inférieure, et une dose supérieure qui doit être la dose la plus faible produisant l'exposition maximale. On prélève ensuite les liquides organiques des animaux

exposés à des intervalles réguliers afin d'y doser la substance d'essai et ses éventuels métabolites. Les animaux sont placés dans des cages métaboliques individuelles pour pouvoir récupérer tous les excréta de l'animal et de pouvoir doser la substance d'essai et les métabolites.

Les résultats obtenus sont les suivants : bilan massique (somme des pourcentages de substance qu'on retrouve dans les différents tissus et excréta), absorption, biodisponibilité, distribution tissulaire, métabolisme, excrétion, etc. Les cinétiques sanguine et tissulaire pourront également être calculées à partir d'échantillons prélevés à intervalle régulier et permettront de suivre l'évolution de la substance dans le sang et les tissus.

Afin de tracer précisément la substance d'essai et de connaître ses métabolites, celle-ci est le plus souvent radiomarquée au ^{14}C . C'est de cette façon qu'on quantifie la substance dans les différents tissus et qu'on identifie ses métabolites. Toutefois, si une autre méthode scientifiquement justifiée permet de tracer les métabolites sans y recourir, l'industriel peut se passer de cette méthode.

Dans certains cas particuliers, il peut être nécessaire de procéder à des études de diffusion tissulaire à doses répétées (les données décrites précédemment sont obtenues après administration d'une dose unique) :

- Lorsque l'étude tissulaire à dose unique laisse présager que la demi-vie tissulaire de notre substance est très supérieure à la demi-vie de la phase d'élimination dans le plasma
- Lorsque les concentrations à l'état d'équilibre de notre substance dans la circulation, déterminées dans une étude à doses répétées, sont nettement supérieures à celles prédites à partir des études à dose unique.
- Lorsqu'on observe des modifications histopathologiques critiques
- Lorsque la substance d'essai est mise au point pour être libérée dans un site déterminé

Dans ces cas-là, on va se servir des études réalisées en dose unique pour déterminer les intervalles de prélèvement, la durée d'administration, ainsi que les doses.

d. Étude de toxicité chronique

Les études de toxicité chronique visent à établir l'impact du produit sur la santé lors d'une exposition prolongée. On cherche à savoir si le médicament candidat pourrait être néfaste lors d'une utilisation à plus ou moins long terme.

En général, il est recommandé de réaliser les études de toxicité sur deux espèces : une espèce de rongeur et une autre espèce de mammifère. L'ICH conseille de réaliser une étude de 6 mois pour l'espèce de rongeur et de 9 mois pour l'espèce de non rongeur. Ces études sont généralement réalisées de façon concomitante avec les études de toxicocinétique. L'animal sera exposé à la substance d'essai de manière répétée pendant la durée de l'étude, ce qui permettra d'observer les divers effets toxiques de la substance sur du plus long terme.

L'OCDE propose une ligne directrice afin d'évaluer la toxicité chronique d'un produit d'essai par voie orale. Une administration quotidienne est recommandée sur plusieurs groupes d'animaux, à des doses progressives et sous surveillance renforcée. Selon les besoins de l'étude, certains groupes peuvent être euthanasiés à différents intervalles (par exemple 3 et 6 mois) pour obtenir des données supplémentaires, notamment au niveau tissulaire. Une note attire l'utilisateur sur le bien-être animal lors de ces études : il est possible de décider d'euthanasier un animal lorsque les effets toxiques sont trop importants, ou bien de réduire ou d'interrompre les doses administrées si cela n'affecte pas l'objectif de l'étude.

La ligne directrice précise des conditions d'hébergement strictes en termes de température, luminosité, cages, humidité, etc. que nous redétaillerons plus bas. Les animaux utilisés, généralement des rats pour les rongeurs, doivent avoir été acclimatés à l'environnement du laboratoire depuis au moins 7 jours, et n'avoir jamais participé à d'autres protocoles expérimentaux. La variation de poids entre les différents individus ne doit pas dépasser les 20%. Ils doivent être affectés de manière aléatoire entre les différents groupes.

En ce qui concerne le nombre d'animaux utilisés, 20 individus pour chaque groupe de dose doivent être envisagés (ce nombre est réduit à 4 pour les non rongeurs).

e. Étude de toxicité aiguë ou à dose unique

Contrairement aux études de toxicité chronique, l'étude de toxicité aiguë a pour but de déterminer la Dose Maximale Tolérée (DMT). Il s'agit de la plus forte dose provoquant des signes de toxicité chez les animaux sans entraîner d'effet majeur sur leur survie. En effet, on souhaite savoir à quelle dose le produit va engendrer des effets indésirables importants. Cependant, la létalité de l'animal ne doit pas être l'effet recherché de ce type d'étude.

Pour cela, on forme plusieurs groupes d'animaux, chacun recevant une dose unique bien précise afin de pouvoir comparer les différences d'observation selon les groupes de dose. On observe ensuite l'animal pendant 14 jours pour voir s'il développe des effets indésirables. Au bout des 14 jours, les animaux survivants sont euthanasiés pour observer d'éventuels autres effets toxiques lors de leur dissection(74).

Auparavant, les études cherchaient à établir la Dose Létale 50 (DL50), c'est-à-dire la dose aboutissant à la mort de 50% des animaux du groupe. Cependant, aujourd'hui ce type de méthode n'est plus utilisé, ce qui a réduit le nombre d'animaux pour ce genre d'étude (environ 3 à 5 animaux de chaque sexe par groupe de dose(74))

En fonction des résultats de l'étude, de plus profondes investigations peuvent être nécessaires pour connaître l'origine de tel effet indésirable, ou pour ajuster la dose efficace prévue lors des essais cliniques. Grâce à cela, on établit une dose toxique à ne pas dépasser si le médicament est mis sur le marché. Selon le plan clinique prévu pour le médicament, des études de toxicité à doses répétées peuvent être demandées (observation d'éventuels effets toxiques lorsque le médicament est administré plusieurs fois).

Il faut bien différencier les études de toxicité à doses répétées et celles à dose unique. Leur but sont différents : l'une cherche à connaître les effets néfastes d'une exposition répétée et à plus long terme, alors que l'autre optimise la dose à ne pas dépasser pour être efficace sans être toxique et tente de déterminer une dose unique au-delà de laquelle l'administration peut être dangereuse. Par exemple, on sait aujourd'hui que le paracétamol n'expose pas aux mêmes risques et n'induit pas les mêmes effets

toxiques lorsqu'il est pris de façon répétée au long cours que lorsqu'il est pris à la dose de 10 grammes en une prise unique.

f. Étude de toxicité pour la reproduction

Un autre point important lorsqu'on souhaite développer un médicament est l'impact sur la capacité de l'homme ou de la femme à se reproduire. Nous le savons aujourd'hui, certaines substances peuvent altérer la fertilité. Il est donc indispensable, avant d'indiquer un produit chez l'homme ou la femme en âge de procréer, de connaître le potentiel toxique sur la reproduction, et ce à tous les stades.

Afin de voir l'impact sur la reproduction, ce type d'étude va suivre l'animal du stade de conception jusqu'au même stade de la génération suivante. Ainsi, on pourra observer si l'exposition au produit d'un couple d'animaux aura un effet sur la fertilité de la génération suivante. Comme toujours, il y aura un groupe témoin permettant la comparaison : le pourcentage d'effets indésirables dans le groupe traité sera comparé à celui dans le groupe non traité.

Le protocole expérimental va dépendre de l'utilisation prévue du produit : produit destiné à usage unique ou usage occasionnel, produit destiné à une prise chronique, etc. L'industriel pourra alors soit réaliser une exposition à une dose unique des groupes d'animaux, et/ou réaliser une exposition sur une période de temps définie. L'ICH ne peut détailler une méthodologie pour tous les cas de figure, mais elle en propose néanmoins une d'approche globale. C'est ensuite à l'appréciation de l'industriel, puis aux autorités de santé, que les études seront jugées suffisantes ou non.

Nous allons détailler plusieurs exemples d'études qui peuvent être utilisés. Pour mieux comprendre, voici un schéma regroupant les différentes étapes du cycle de reproduction étudiées ci-dessous :

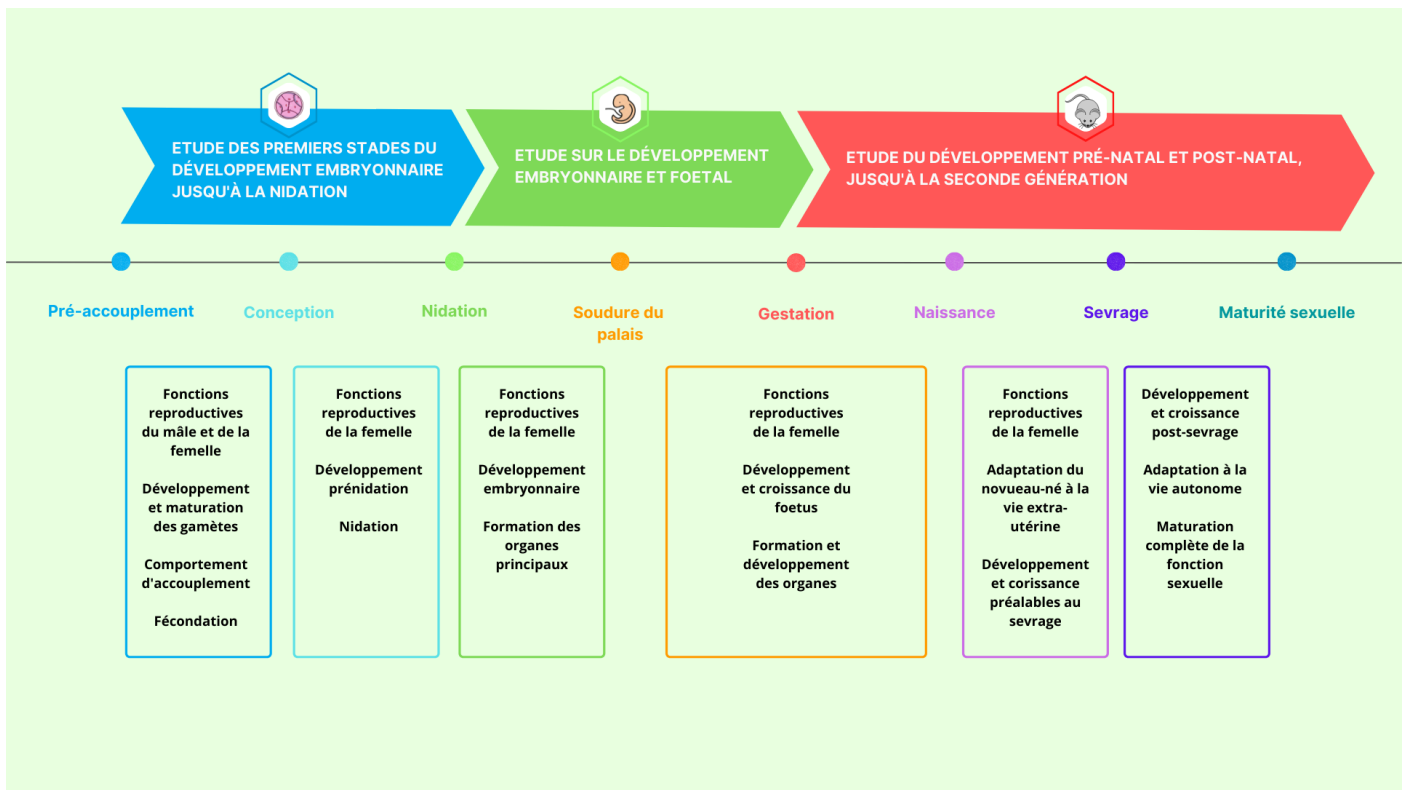


Figure 19 Les différentes étapes du cycle de reproduction chez le rat

Le choix de l'espèce animale revient à l'industriel, mais ce choix doit être justifié et fonction du candidat médicament testé. Le rat est généralement l'espèce recommandée car c'est un bon modèle pour lequel on dispose de nombreuses informations concernant sa physiologie, sa reproduction, etc. et de nombreuses études de toxicité ont déjà été menées sur le rat. L'ICH rappelle que chaque espèce présente des avantages mais aussi des inconvénients dont voici quelques exemples :

- Le rat n'est pas l'espèce idéale pour l'essai d'agonistes de la dopamine car ces molécules influent sur la prolactine qui est nécessaire à l'établissement et au maintien de la gestation.
- Les souris sont sensibles au stress, le fœtus d'une souris est par ailleurs de petite taille ce qui le rend plus difficilement observable.
- Les lapins ne sont en général pas recommandés car on manque de données à leur sujet (tout comme les cobayes, les cochons nains, les furets), et ils présenteraient des signes cliniques parfois difficiles à interpréter.
- Les chiens ont une reproduction basée sur la saisonnalité, ce qui complique les études. On dispose également de peu d'études de toxicité avec cette espèce.

- Concernant les primates, il n'y a aucune raison de les privilégier par rapport aux rats car on dispose encore moins d'informations sur leur reproduction, et le nombre de sujet qu'on peut utiliser est généralement trop faible.

Sauf justification contraire, les études s'appuieront sur deux groupes de dose et un groupe témoin, et se poursuivront sur deux générations consécutives.

Étude de la fertilité des premiers stades du développement embryonnaire jusqu'à la nidation :

- But : détecter les effets toxiques du traitement pendant les stades de maturation des gamètes, sur le cycle oestral de la femelle, le transport tubaire, sur le comportement d'accouplement, fertilité, prénidation du développement embryonnaire, nidation, et sur la maturation du sperme du mâle.
- Espèces utilisées : au moins une espèce, le rat de préférence. Le choix doit être cohérent avec le reste des études de toxicité afin de pouvoir comparer les résultats. Idéalement, la souche de rat utilisée doit être la même (les éleveurs fournissant les souches de rat ou de souris, indiquent généralement la taille moyenne de la portée, l'indice de productivité, ou encore la durée moyenne de la gestation, ce qui permet une meilleure comparaison).
- Nombre : idéalement 16 à 20 portées, mais il existe peu de données scientifiques à ce sujet, ce qui fait que plus l'espèce choisie coûte cher, moins le groupe compte de sujet. Par ailleurs, la taille du groupe va dépendre des attentes des chercheurs, selon qu'ils veulent mettre en évidence un effet à fréquence élevée (auquel cas peu d'animaux sont nécessaires) ou bien présumer d'une absence d'effets (plus d'animaux nécessaires).
- Période d'administration : pour les mâles, 4 semaines pré-accouplement et continuer pendant l'accouplement jusqu'au sacrifice des mâles ; pour les femelles, 2 semaines pré-accouplement et continuer jusqu'à la nidation.
- Accouplement : rapport 1:1 conseillé, prévoir l'identification des deux parents d'une portée

- Sacrifice des animaux en fin d'étude : les femelles peuvent être sacrifiées n'importe quand après la mi-gestation ; les mâles peuvent être sacrifiés n'importe quand après l'accouplement (mais s'assurer qu'il y a bien une gestation d'entamée avant). Il est possible de ne pas sacrifier les mâles tout de suite afin de les mettre en présence de femelles non traitées et vérifier s'ils sont féconds ou non.
- Observation :
 - Au cours de l'étude : signes et mortalité, poids corporel, apport alimentaire, frottis vaginaux, autres observations d'intérêt
 - Au moment du sacrifice : nécropsie de tous les adultes, examen des organes (groupe traité et groupe témoin) et notamment des testicules, épидидymes, ovaires et utérus, compter les corps jaunes et les sites de nidation, compter les produits de conception morts et vivants. L'examen histopathologique des testicules constitue le moyen le plus efficace de détecter les effets sur la spermatogénèse (contrairement au simple accouplement avec une femelle).
 - L'analyse du sperme peut servir, à titre optionnel, pour la confirmation ou une meilleure caractérisation des effets observés.

Étude des effets sur le développement prénatal et postnatal, y compris la fonction maternelle :

- But : détecter les effets défavorables sur la femelle gestante/allaitante et sur le développement des produits de conception et de la descendance à la suite de l'exposition de la femelle pendant la période allant de la nidation au sevrage.
- Effets indésirables à évaluer : niveau accru de toxicité par rapport aux femelles non gestantes, décès prénatal et postnatal de descendants, altération de la croissance et du développement, déficits fonctionnels chez les descendants
- Espèce : au moins une espèce, le rat de préférence
- Nombre d'animaux : idem
- Période d'administration : depuis le stade de la nidation jusqu'à la fin de la lactation

- Méthode expérimentale : les femelles peuvent mettre bas et élever leurs petits jusqu'au sevrage ; à ce moment, un mâle et une femelle sont choisis dans chaque portée pour poursuivre leur développement jusqu'à l'âge adulte et s'accoupler, de façon à ce que l'on puisse vérifier leurs capacités reproductrices.
- Observations : poursuivre jusqu'à la maturité sexuelle (en cas d'effets différés)
 - Au cours de l'étude : signes et mortalité, poids corporel, apport alimentaire, durée de la gestation, parturition (= mise-bas)
 - Au moment du sacrifice (pour les femelles ayant mis bas et si nécessaire pour la descendance) : nécropsie, préservation et évaluation des organes, nidations, anomalies, naissances vivantes, morts-nés, poids corporel de naissance, suivi présevrage et postsevrage (ouverture du vagin, segmentation du gland balano-préputial → indiquent le début de la maturité sexuelle), développement physique, fonctions sensorielles et réflexes (pour les évaluer, pas de méthode spécifique recommandée), comportement
- Traitement de la descendance : l'administration du produit d'essai ne dure que jusqu'à la lactation, donc elle ne couvre pas l'exposition au cours de la période allant du sevrage à la puberté. Pour détecter les effets indésirables de produits d'essai pouvant être utilisés de la petite enfance à l'adolescence, il faudra envisager de procéder à des études spéciales (méthodologie établie cas par cas) prévoyant le traitement de la descendance directement, à des âges déterminés.

Étude des effets sur le développement embryonnaire et fœtal :

- But : détecter les effets indésirables sur la femelle gestante et sur le développement de l'embryon et du fœtus, à la suite de l'exposition depuis le stade de la nidation jusqu'à la soudure du palais dur.
- Effets indésirables à évaluer : niveau accru de toxicité par rapport aux femelles non gestantes, décès d'embryons et de fœtus, altération de la croissance, changements structuraux

- Animaux : habituellement deux espèces → un rongeur (le rat de préférence) et un non-rongeur (le lapin de préférence)
- Nombre : idem
- Période d'administration : du stade de la nidation à celui de la soudure du palais dur.
- Méthode expérimentale : les femelles doivent être sacrifiées et examinées environ un jour avant la parturition. Tous les fœtus devraient être soumis à un examen visant à établir leur viabilité et à détecter les anomalies, de façon individuelle. Généralement, un examen du squelette est réalisé chez 50% des rats, et un examen des viscères chez les 50 autres %.
- Observations :
 - Au cours de l'étude (pour les femelles ayant mis bas) : signes et mortalité, poids corporel, apport alimentaire, autres observations jugées nécessaires
 - Au moment du sacrifice : nécropsie, préservation des organes et évaluation histologique, numération des corps jaunes, nombre d'œufs vivants ou morts ayant atteint le stade de nidation, poids corporel de chaque fœtus, anomalies fœtales, évaluation sommaire du placenta

Lorsque cela est possible, ces études peuvent être combinées du moment que la période d'administration de la substance d'essai est cohérente avec le but de l'épreuve. Le choix d'une méthode à un seul segment (étude de fertilité et étude prénatale et postnatale réalisées en une seule fois) ou d'une méthode à deux segments revient à l'industriel qui doit alors justifier son choix. L'examen des fœtus est, dans les deux cas, indispensable.

g. Études d'innocuité pour les essais cliniques

Toutes les études dont nous avons précédemment parlé sont des études visant à établir la sécurité dans l'utilisation du produit commercialisé. Elles se font dans le cadre d'une posologie thérapeutique préalablement établie. Les études d'innocuité se basent sur ces informations mais vont également chercher des effets néfastes que

n'auraient pas pu détecter ces études, notamment en allant au-delà de la dose thérapeutique prévue.

L'objectif de ces études d'innocuité sont les suivants :

- Déterminer les propriétés pharmacodynamiques indésirables d'une substance qui pourraient affecter l'innocuité de cette dernière chez les sujets humains : ce sont les effets auxquels on s'attend compte tenu de la cible de notre substance (effets pharmacodynamiques primaires) mais également ceux auxquels on ne s'attend pas (effets pharmacodynamiques secondaires). Par exemple, on sait que les agonistes dopaminergiques entraînent souvent des addictions, c'est un effet qui découle de l'effet thérapeutique (stimuler la transmission dopaminergique). En revanche, on ne s'attendait pas à ce que les antipsychotiques allongent l'intervalle QT (c'est un effet pharmacodynamique secondaire).
- Évaluer les effets pharmacodynamiques et/ou physiopathologiques indésirables d'une substance observée dans les études toxicologiques et/ou cliniques : il s'agit d'approfondir et de déterminer les caractéristiques des effets indésirables qu'on a pu observer lors des précédentes études précliniques (cancérogénicité, toxicité aiguë/chronique, etc.) ou bien lors de précédentes études cliniques (si cette substance a déjà été commercialisée dans une autre indication, ou bien à l'étranger, etc.).
- Étudier le mécanisme d'action des effets pharmacodynamiques indésirables observés et/ou soupçonnés : on cherchera à comprendre ce qui déclenche les effets indésirables observés, dans quelle mesure ils apparaissent, comment pourrait-on les prendre en charge, etc.

L'ICH précise qu'il est important de cibler de façon prioritaire dans ces études les fonctions vitales. Un effet indésirable sur le système cardiovasculaire, le système respiratoire, ou le système nerveux central est un effet qu'il faut étudier en priorité. Selon la population cible de la substance étudiée, d'autres fonctions seront essentielles à prendre en compte (par exemple fonction oculaire dans le cadre d'un traitement pour une pathologie oculaire justement).

Ces études peuvent être réalisées *in vitro* et *in vivo*. Il est conseillé de ne pas se fonder uniquement sur des tests *in vitro*, ceux-ci viendront en complément pour approfondir le mécanisme d'action ou le profil d'activité de la substance. Pour les études *in vivo*, les modèles animaux devront être choisis en tenant compte de leur sensibilité à la substance étudiée, de leur âge, de leur sexe, etc. afin de choisir le modèle animal le plus adapté au produit testé. Lors de ces études, il est préférable de ne pas anesthésier les animaux dans le but de pouvoir observer une éventuelle altération de leur mobilité, de leur comportement, etc. Par conséquent, il sera absolument nécessaire de prendre en charge une éventuelle douleur ou inconfort.

Le médicament étudié est généralement administré à dose unique, mais il peut y avoir plusieurs groupes de doses afin d'étudier la relation dose-effet. La voie d'administration utilisée est celle prévue chez l'homme.

Exemples d'études dans le cadre des études d'innocuité :

- Étude du système nerveux central : observation de l'activité motrice, du comportement, de la coordination, des réflexes sensori-moteurs, de la température corporelle.
 - Batterie d'observation fonctionnelle(75) : il s'agit d'observations menées sur les animaux dans le cadre de leur cage habituelle (coordination motrice, niveau d'activité), puis dans la main de l'observateur (salivation, larmoiement, piloérection, réactivité), et enfin dans un environnement ouvert pour observer l'exploration de l'animal (démarche de l'animal, niveau d'éveil, niveaux d'excrétion). L'observateur va également tester les réflexes de l'animal avec un clicker métallique, une pince ou un stylo qui s'approche de l'animal, etc. afin de voir s'il garde tous ses réflexes.
 - Test modifié d'Irwin(76) : observation des modifications comportementales, de la température rectale, du diamètre pupillaire, présence de convulsion, excitation, sauts, incoordination motrice, perte d'équilibre, comportements stéréotypiques, agressivité, etc. Généralement, ce test évalue 6 doses différentes (allant de la dose thérapeutique estimée à une dose 100 fois plus élevée si cela est

possible) et l'observation commence immédiatement après l'administration et pendant 48 heures.

- D'autres tests peuvent être utilisés pour évaluer la neurotoxicité, au choix de l'industriel, mais toujours à justifier.
- Étude du système cardiovasculaire : observation de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque, et réalisation d'un électrocardiogramme. Peuvent être utiles également l'étude des troubles de la repolarisation et des anomalies de conductance.
- Étude du système respiratoire : observation de la fréquence respiratoire, du volume respiratoire, et de la saturation en oxygène notamment.
- Étude du système rénal : évaluation du volume urinaire, de la densité urinaire, osmolalité urinaire, pH urinaire, équilibre des liquides et électrolytes, protéines urinaires et sanguines (créatinine, azote uréique, protéines plasmatiques), cytologie urinaire.
- Étude du système nerveux autonome : étude de la liaison aux récepteurs, réaction aux agonistes/antagonistes, stimulation directe des nerfs autonomes, exploration du baroréflexe, variabilité de la fréquence cardiaque
- Étude du système gastro-intestinal : évaluation de la sécrétion gastrique, lésions gastro-intestinales, sécrétion biliaire, durée du transit, contraction iléale, mesure du pH gastrique.

Ces informations seront consciencieusement inscrites dans le dossier d'autorisation de mise sur le marché. Il n'est pas possible d'obtenir une substance dénuée d'effets indésirables et l'objectif de tous ces tests n'est pas d'écarter le candidat s'il présente ce type d'effets néfastes. Les effets indésirables sont à prendre en compte et à évaluer selon la balance bénéfique/risque. Si un potentiel traitement anticancéreux se révèle être à l'origine de nausées comme effet secondaire, ça n'empêchera pas sa commercialisation. En effet, le bénéfice qu'on tirerait à utiliser cette molécule – la possible guérison d'un cancer – est supérieur au risque d'avoir cet effet indésirable – de type nausées. On préférera commercialiser un anticancéreux efficace mais donnant des nausées, que d'écarter une molécule potentiellement thérapeutique pour une

pathologie grave. D'autant plus s'il s'agit d'un effet indésirable qu'on peut gérer par d'autres moyens médicamenteux ou non.

En revanche, si un effet indésirable est détecté et met en jeu le pronostic vital, il y a de grandes chances pour que la balance bénéfique/risque soit défavorable et que le médicament ne voit jamais le jour. Par exemple, on ne commercialisera pas un antalgique pour les douleurs de ventre qui induit des troubles du rythme cardiaque.

h. Études d'immunotoxicité

L'immunotoxicité se définit comme « une suppression ou une stimulation non intentionnelle du système immunitaire, elle n'englobe pas l'hypersensibilité ou l'auto-immunité provoquées par des médicaments ». C'est-à-dire qu'on entend par immunotoxicité tout effet sur l'immunité, que ça soit en augmentant ses capacités de manière exagérée (par exemple une substance qui aggraverait une réaction allergique), ou en les affaiblissant de façon involontaire (par exemple une substance qui diminue le taux de globules blancs). Ne sont pas compris dans cet aspect les réactions d'hypersensibilité, qui sont des réactions inadaptées du système immunitaire face à une substance non pathogène (hypersensibilité à l'amoxicilline par exemple décrit une réaction disproportionnée du système immunitaire face à l'amoxicilline) ; ainsi que les phénomènes d'auto-immunité (réaction immunitaire contre des cellules ou des antigènes du soi). En effet, ces réactions ne sont pas vraiment prévisibles : tout le monde peut développer une hypersensibilité à une substance médicamenteuse ou non.

Les études d'immunotoxicité ont pour but principal d'identifier les substances qui auront un impact sur le système immunitaire de la population cible. Les médicaments étudiés dans le cadre d'immunotoxicité peuvent appartenir à deux groupes selon l'ICH :

- Les médicaments dont la fonction est de moduler la réponse immunitaire à des fins thérapeutiques (la modulation du système immunitaire est donc voulue) mais dont une immunosuppression est considérée comme le résultat d'une activité pharmacodynamique exagérée. Par exemple, un traitement pour le

rejet d'une greffe vise à réduire le système immunitaire de sorte qu'il ne rejette pas l'organe greffé étranger au soi, sans pour autant empêcher l'individu de se défendre contre des agressions extérieures. Dans ce cas, une immunosuppression n'est pas désirée (on veut que le système immunitaire du patient soit toujours actif mais suffisamment bas pour ne pas rejeter le greffon) et est considérée comme une réaction pharmacodynamique exagérée.

- Les médicaments dont la fonction n'est pas d'agir sur le système immunitaire mais qui s'avèrent immunotoxiques, notamment parce qu'ils entraînent l'apoptose de cellules immunitaires ou qu'ils se lient à des récepteurs communs aux tissus cibles et aux cellules immunitaires non ciblées. C'est le cas par exemple de certaines chimiothérapies qui ne sont pas toujours spécifiques des cellules cancéreuses et peuvent induire des dommages aux lignées cellulaires du système immunitaire. L'immunosuppression n'est pas désirée.

Afin d'évaluer le potentiel immunotoxique des substances à l'étude, l'industriel doit se baser sur des données qu'il aura acquies préalablement telles que les résultats des précédentes épreuves de toxicité, des similitudes structurelles avec d'autres composés immunotoxiques, les propriétés de la substance à l'étude, des données cliniques s'il en existe, la population ciblée (immunodéprimés), etc. En fonction de ces éléments, il doit entamer des évaluations supplémentaires d'immunotoxicité ou justifier la non-nécessité d'évaluations supplémentaires.

Quels éléments doivent motiver la recherche approfondie d'immunotoxicité ?

- Lors des études de toxicité : altérations hématologiques (leucocytopenie ou leucocytose, granulocytopenie ou granulocytose, lymphopenie ou lymphocytose), variations pondérales, altérations histologiques du thymus, de la moelle osseuse, de la rate, ou des ganglions lymphatiques, variation de la globulinémie, augmentation de l'incidence des infections et/ou de tumeurs.
- Propriétés pharmacologiques : caractéristiques connues de la substance qui laissent penser qu'elle pourrait avoir un effet sur le système immunitaire
- Population ciblée : patients immunodéprimés
- Ressemblances structurelles avec des agents immunotoxiques

- Élimination de la substance : si la substance se retrouve à des concentrations élevées dans les cellules du système immunitaire
- Données d'études cliniques

En fonction de ces éléments, l'investigateur décidera de mener des études d'immunotoxicité supplémentaires afin d'en découvrir le mécanisme d'action, les cellules ciblées par l'effet, et la réversibilité des effets immunotoxiques. Pour cela, il est généralement recommandé de mener une étude chez des rongeurs où les animaux sont exposés quotidiennement à la substance pendant 28 jours (avec des groupes de chaque sexe sauf justification contraire). Il est préférable d'utiliser la même espèce, la même souche, et la même voie d'exposition que durant les études précédentes qui ont mené à ces investigations supplémentaires. La dose administrée doit être supérieure à la dose sans effet nocif observé mais inférieure à la dose entraînant des effets secondaires associés au stress. La constitution de différents groupes de dose est recommandée pour définir une relation dose-effet. Ces études serviront donc à analyser les aspects suivants de manière plus approfondie :

- Réponse anticorps T-dépendante : l'intérêt est d'observer le comportement des anticorps face à une agression lorsque l'organisme est exposé à la substance d'essai. Pour cela, on expose le groupe d'animaux traités à la substance ainsi qu'un groupe témoin non traité, à un antigène T-dépendant reconnu (globules rouges de mouton par exemple) puis on dose les anticorps à la suite de cette réaction. On compare le taux d'anticorps dans notre groupe traité et notre groupe témoin. Un taux d'anticorps plus élevé dans le groupe témoin suggère que la substance à l'essai pourrait diminuer l'action du système immunitaire, notamment des cellules impliquées dans la production d'anticorps.
- Immunophénotypage : cette épreuve sert à dénombrer les différentes populations de leucocytes soit par cytométrie de flux soit par immunohistochimie. Ainsi, on peut savoir quel type de cellules est impliqué dans la réponse immunitaire. Ce test peut recourir au sacrifice des animaux suite à leur exposition afin d'extraire les tissus ciblés.

- Analyse de l'activité des cellules NK : ce sont des cellules cytotoxiques chargées d'éliminer les cellules tumorales ou infectées par un pathogène viral par exemple. Il peut être intéressant d'analyser leur réponse si leur nombre se trouve modifié lors de l'immunophénotypage. L'analyse des cellules NK a généralement recours au sacrifice des animaux afin d'extraire les tissus en vue de l'analyse.
- Études de la résistance de l'hôte : c'est une étape permettant d'observer comment se comporte un pathogène au sein d'un hôte traité par la molécule d'essai. On infecte volontairement un groupe d'animaux préalablement exposé à la substance d'essai et on observe ses défenses immunitaires. L'idée est de voir si un pathogène peut être plus infectieux quand l'hôte est exposé à la substance d'essai. Cette épreuve vaut aussi pour des cellules tumorales (l'hôte est-il plus sensible aux tumeurs lorsqu'il est traité ?). Parmi les pathogènes utilisés, il y a *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*... C'est une étape importante car certains composés stimulent la prolifération de cellules, dont les cellules tumorales, ou alors peuvent stimuler la réponse immunitaire. Ce sont des éléments à prendre en compte dans le cadre thérapeutique.
- Épreuve fonctionnelle à l'égard des macrophages et des neutrophiles : comme pour les cellules NK, on va chercher à observer le comportement des macrophages et des neutrophiles lorsqu'ils sont exposés à la substance d'essai. Cela se fait soit *ex vivo* (sur des organes extraits de l'animal) lorsque ce sont les animaux qui ont été exposés, soit *in vitro* lorsque ce sont directement les cellules en question qu'on expose à la substance.
- Épreuves visant l'immunité à médiation cellulaire : les cellules NK, les macrophages et les neutrophiles font partie de l'immunité innée, celle qui intervient directement pour lutter contre le pathogène, la défense de première ligne non spécifique. La réponse immunitaire à médiation cellulaire est une réponse spécifique à un type de pathogène, c'est elle qui est mise en jeu dans le principe d'immunisation vis-à-vis d'un virus par exemple et permet ainsi la production d'anticorps. Ici, on souhaite savoir si l'exposition à la substance d'essai modifie la réponse à médiation cellulaire : est-ce que l'hôte peut développer des réponses spécifiques différentes lorsqu'il est sous traitement ? Notamment, peut-il développer des cas d'hypersensibilisation retardée ?

i. Sécurité des produits anticancéreux

L'évaluation de la sécurité des produits anti-cancéreux diffère de celle des autres classes médicamenteuses. Compte tenu de l'urgence vitale d'obtenir un traitement pour combattre les pathologies cancéreuses, il a été décidé d'alléger les démarches administratives concernant les médicaments anticancéreux, sans pour autant en négliger la sûreté. Il est toujours question de balance bénéfices/risques et donc, le médicament anticancéreux peut « se permettre » d'avoir plus d'effets secondaires car l'effet thérapeutique qu'on espère en tirer est supérieur.

La majeure partie du temps, les études cliniques se réalisent sur des patients atteints d'un cancer au dernier stade, car l'utilisation de produits encore en cours de développement représente une dernière chance. C'est d'ailleurs souvent après avoir testé d'autres traitements classiques que ces patients en viennent à intégrer le développement clinique. C'est pour ces mêmes raisons que les autorités de santé ont voulu faciliter l'accès à des traitements expérimentaux.

Dans le même temps, cela amoindrit les « chances » de prouver l'efficacité de ces produits, car il est plus difficile de traiter un cancer au stade terminal qu'un cancer en début d'évolution. Mais l'obtention de données cliniques est primordiale.

Les directives établies par l'ICH de cette section ne concernent pas les produits visant à *prévenir* le cancer, ou les produits palliant les effets secondaires des traitements anticancéreux, ou encore les vaccins. La thérapie génique ou cellulaire n'est pas concernée non plus.

Cette partie de l'évaluation du médicament reposera sur de nombreuses étapes précédemment décrites, dont les études de toxicologie ainsi que celles de pharmacocinétiques. Cela permettra d'avoir déjà une base solide pour déterminer le choix de la dose dans les essais cliniques, la fréquence d'administration, etc. Pour accélérer le développement de ce type de médicaments, il n'est pas obligatoire de connaître la dose sans effet nocif observé, ni la dose sans effet observé, ni même la réversibilité de la toxicité. De même, la toxicologie de la reproduction n'est pas considérée essentielle pour les essais cliniques ciblant des patients atteints d'un

cancer avancé. En revanche, on peut s'appuyer sur les effets attendus et observés sur les organes reproducteurs dans les études précédentes.

En réalité, pour l'évaluation spécifique des produits anticancéreux, les animaux vont principalement servir à préparer les essais cliniques – en dehors des étapes précédemment décrites (évaluation toxicologique, pharmacocinétique, etc.). Il s'agira de déterminer la dose initiale pour commencer les essais cliniques chez l'homme, la fréquence d'administration du médicament, etc. Pour cela, on réalise plusieurs groupes de doses (toujours selon les données déjà acquises sur le produit) comprenant 3 animaux par sexe et par dose.

j. Étude du potentiel phototoxique(77)

Le potentiel phototoxique d'un médicament doit être évalué avant qu'un grand nombre de personnes soit exposé afin de mettre en place des mesures de précaution avant son utilisation. Ce potentiel phototoxique regroupe 4 effets observés :

- La phototoxicité : réaction tissulaire aiguë causée par un produit chimique photoréactif. C'est une réaction inflammatoire à la suite d'une exposition solaire qui ressemble le plus souvent à un coup de soleil. C'est le mécanisme le plus fréquent.
- La photoallergie : réaction à médiation immunitaire à un produit chimique causée par la formation de photoproduits à la suite d'une réaction photochimique. Il s'agit là d'une réaction allergique à un composé qui devient allergène à la suite de l'exposition solaire.
- La photogénotoxicité : non abordé dans les lignes directrices
- La photocancérogénicité : non abordé dans les lignes directrices

La photosensibilisation regroupe n'importe quel effet tissulaire observé à la suite d'une exposition à la lumière. On peut parfois « prévoir » les effets phototoxiques d'un composé en fonction de sa structure (si le composé absorbe la lumière de 290 à 700 nm), ou bien s'il se diffuse dans les tissus exposés à la lumière. C'est pourquoi il est utile de connaître le spectre d'absorption d'une molécule avant d'entamer l'évaluation du potentiel phototoxique.

L'ICH propose une épreuve (préalablement créée par l'OCDE pour les substances solubles) *in vitro* qui convient à l'évaluation phototoxique des substances pharmaceutiques par voie topique. Ce test dispose d'une forte sensibilité, c'est-à-dire qu'un résultat négatif à l'épreuve indique fort probablement l'absence de phototoxicité chez l'homme. Un résultat positif doit mener à des investigations supplémentaires et n'est pas une preuve suffisante d'une réelle phototoxicité. Il existe pour cela des modèles d'épiderme humain reconstitué : ils reproduisent la structure de la peau et permettent l'évaluation de la viabilité des cellules avec et sans irradiation aux UV-A et B, mais il faut faire attention au modèle choisi.

Pour des produits administrés par voie générale, il est possible d'utiliser des épreuves *in vivo* mais l'ICH n'établit aucune méthodologie normalisée. Elle préconise de tenir compte de divers facteurs pour que ces épreuves soient plus optimisées :

- Choisir une espèce sensible à l'irradiation (les espèces non pigmentées sont plus sensibles, mais certains produits nécessitent de se lier à la mélanine pour être en concentration suffisante pour en évaluer la phototoxicité)
- Connaître le T_{max} pour exposer l'animal au moment où le produit atteindra sa concentration maximale dans les tissus. En général, l'exposition se fait sur quelques jours.

L'évaluation de la phototoxicité n'a pas de recommandations, c'est donc au fabricant de choisir la méthode la plus adaptée. Les données cliniques sont les plus pertinentes, suivies des données obtenues *in vivo*, puis *in vitro*. Cela ne signifie pas qu'une épreuve clinique est toujours nécessaire, tout dépend de l'épreuve choisie et de sa sensibilité.

L'ICH émet des recommandations sur la stratégie à adopter en fonction des caractéristiques du candidat :

- Si le coefficient d'absorption molaire est inférieur à $1000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, il n'est pas nécessaire de réaliser une évaluation plus poussée du potentiel phototoxique. On considère alors que le risque de développer une phototoxicité est très faible.
- Si le coefficient d'absorption molaire est supérieur à $1000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, le fabricant devrait faire une évaluation du potentiel phototoxique. En fonction du résultat, des données supplémentaires devront être fournies (données cliniques et non cliniques). De manière générale, on a d'abord recours à une méthode *in*

vitro (épreuve 3T3 NRU comme cité plus haut). Si le résultat est négatif, il n'est pas utile d'aller plus loin. Il est également possible d'évaluer la phototoxicité par des données cliniques (chez l'homme). Quelle que soit les résultats obtenus, ils sont soumis à interprétation et dépendent bien évidemment de la dose utilisée. Des résultats positifs sont à nuancer s'ils sont obtenus largement au-delà d'une dose thérapeutique.

En revanche, il n'est pas obligatoire de réaliser des études de photoallergie car ces réactions sont rares et l'ICH rappelle qu'il n'existe aucune épreuve (non clinique) certifiée pour prédire ce type d'effet.

Rappelons que toutes ces informations sont décisives pour l'avenir du candidat médicament et pour la sécurité des futurs patients. Il est important d'obtenir des données fiables pour en évaluer la balance bénéfices/risques. Les éléments présentés ci-dessus ne sont que des recommandations, non des obligations. Cependant, le médicament est soumis à une autorisation de mise sur le marché. Les autorités de santé n'accorderont cette AMM uniquement si les données fournies sont pertinentes. Un laboratoire ne suivant pas ces recommandations, sans justification scientifique valable, ne pourra pas se voir accorder le droit de mettre le produit en question sur le marché. Pour la même raison, il ne s'agit pas de ligne directrice stricte : en justifiant son choix, un laboratoire peut déroger à ces recommandations si cela s'avère nécessaire pour évaluer l'innocuité ou l'efficacité du médicament.

Comme nous avons pu le voir, le recours aux tests *in vivo* est fréquent lors de l'évaluation d'un médicament candidat. Lorsqu'il est possible d'obtenir des données fiables via les tests *in vitro*, ceux-là sont fortement préférés puisqu'ils permettent de limiter le recours aux animaux, et donc c'est un gain de temps et d'argent. Les tests *in vivo* restent pour l'instant le seul moyen d'obtenir des données précliniques dans certains cas : il n'est pas encore possible de reproduire un organisme entier de manière artificielle – avec la multitude d'interactions existantes entre les différents organes, cellules, tissus. Dans certains cas bien particuliers, la science a déjà franchi le pas : c'est le cas notamment d'un modèle artificiel d'épiderme humain que l'on peut utiliser pour tester la phototoxicité par voie topique. Mais dans ce même cas de figure,

on ne peut l'utiliser pour tester un produit inoculé par voie systémique car ce modèle n'est pas relié à un système vasculaire, ni à des organes métabolisant le médicament et qui en modifieraient les concentrations ou qui génèreraient des métabolites toxiques.

Bien que les modèles animaux restent nécessaires, des efforts ont été consentis et depuis ces dernières décennies, le recours à l'expérimentation animale a été fortement réduit. Entre 1984 et 1999, le nombre d'animaux utilisés pour le développement de médicaments a diminué de moitié(78). Aujourd'hui, il est obligatoire de recourir à des méthodes alternatives lorsque cela est possible, c'est-à-dire lorsque les résultats obtenus avec ces méthodes alternatives ont été validés et permettent d'obtenir les mêmes informations avec le même degré de sûreté qu'avec des modèles animaux.

Toutes ces données sont consciencieusement recueillies et feront partie du dossier d'autorisation de mise sur le marché. Mises bout à bout, comparées entre elles, ces données donneront une vision plus globale de l'innocuité du médicament. Ce dossier sera évalué par une commission de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament qui décidera in fine si celui-ci peut être commercialisé sans risque ou non.

A l'issue de ces différentes étapes, une dose toxique aura été déterminée afin de savoir à quelle dose commencer les essais cliniques sur l'homme. Si le profil de toxicité est trop important, le candidat médicament ne passera généralement pas à la prochaine étape. Ainsi, ce n'est qu'une fois tous ces éléments déterminés, que le candidat médicament pourra passer aux phases suivantes : les tests sur l'homme.

IV. Autres utilisations des animaux en recherche et production pharmaceutique

1. Utilisation des animaux dans la détection de cancers

Il est bien connu que les chiens, comme tous les canidés, ont un sens de l'odorat très développé. Ce sens a été mis à profit dans la recherche comme méthode de détection des cancers. En 2006, l'équipe de Michael McCulloch a entraîné des chiens ordinaires

à détecter des échantillons de souffle (contenant des composés organiques volatiles) de patients atteints de cancer du poumon et de cancer du sein(79). Les chercheurs ont entraîné 5 chiens ordinaires (qui n'avaient pas reçu d'autres apprentissages que ceux classiques d'un chien domestique) à différencier les échantillons de personnes malades de ceux de personnes saines, en utilisant le renforcement positif (récompense, ici avec de la nourriture, lorsque le chien présentait le bon comportement). Pour cela, ils ont utilisé 27 échantillons de patients atteints d'un cancer des poumons, 25 échantillons de patients atteints d'un cancer du sein, et 66 échantillons de personnes saines. En l'espace de 3 semaines, les chiens avaient appris à distinguer les échantillons malades des échantillons sains. Pour confirmer leur test, ils ont ensuite présenté différents échantillons (28 cancers du poumon, 6 cancers du sein, et 17 contrôles) que les chiens n'avaient jamais sentis au cours de cette étude, afin de voir s'ils parvenaient à marquer les échantillons de personnes malades, comme dans l'étude. Ce dernier test a été fait en double aveugle : ni les chercheurs qui observaient, ni les personnes tenant les chiens, n'étaient capables d'identifier l'échantillon. Les résultats ont été bluffant puisque les chiens ont démontré une capacité à détecter les échantillons malades avec une sensibilité (= avoir le moins de faux négatifs) et une spécificité (= avoir le moins de faux positifs) de 99% pour le cancer du poumon, et une sensibilité de 88 et une spécificité de 98% pour le cancer du sein. Les chercheurs envisagent après cela, de vérifier que les chiens détectent bien une odeur spécifique au cancer, et non une odeur autre (qui pourrait être due à l'inflammation ou à une infection).

Une autre étude, menée par l'infirmière Isabelle Fromantin, montre l'intérêt d'utiliser l'odorat du chien dans la détection du cancer du sein. Une première étude en 2017 a montré que deux chiens, éduqués par leur équipe, pouvaient détecter 90% des échantillons positifs sur 130 échantillons totaux. Les échantillons utilisés sont des compresses apposées sur le sein de la personne malade ou saine pendant une nuit(80). Cette étude a donné au lieu au projet KDOG soutenu par l'Institut Curie.

Il y a même une équipe de chercheurs français qui a étudié l'utilisation de fourmis pour la détection de cancer(81).



Pour en savoir plus au sujet des chiens détecteurs de cancer,
découvrez le projet KDOG

2. Utilisation des animaux comme une source de médicaments

Certaines des molécules utilisées aujourd'hui en médecine sont produites par des organismes vivants. Il s'agit généralement de molécules trop complexes pour être synthétisées tels que des hormones, des grandes protéines, ou des anticorps.

Nous allons détailler ici quelques exemples dignes d'intérêt.

a. *L'histoire de l'insuline*

Le 11 janvier 1922, un petit garçon de 14 ans fut le premier à recevoir une dose d'insuline extraite et purifiée à partir de pancréas de bœuf (82,83). L'essai fut concluant et la santé du jeune garçon s'améliora, notamment à la suite d'injections d'extraits mieux purifiés. Cette découverte a été menée par Banting et Macleod qui reçurent le prix Nobel de Médecine à cette occasion. Grâce à un partenariat entre l'Université de Toronto et le laboratoire Lilly, la production en masse d'insuline issue de pancréas de porc et de bœuf, a pu se concrétiser et ouvrir la voie à d'autres évolutions. Dans cet accord, le laboratoire s'engage à produire et fournir gratuitement l'insuline aux chercheurs pour les essais cliniques, puis, si ceux-ci sont concluants, à la vendre à prix coûtant.

Ainsi, jusque dans les années 1990, l'insuline provenait de bœufs et de porcs. C'était la seule façon de traiter les personnes diabétiques, bien que l'insuline animale provoquât parfois des rejets. Aujourd'hui, les insulines d'origine synthétique produites par génie génétique (via des bactéries généralement) ont largement supplanté les insulines animales (elles présentent un meilleur profil de tolérance et il en existe plusieurs selon leur durée d'action). Un seul médicament à base d'insuline animale reste commercialisé aujourd'hui(84) : Hypurin®, mais il est très rarement utilisé et réservé aux patients qui ont mal toléré le passage sous insuline humaine.



Pour en savoir plus au sujet de la découverte et du développement de l'insuline

b. Production d'anticorps

Les anticorps ont de multiples usages dans le monde médical. Ils font aujourd'hui partie intégrante de notre arsenal thérapeutique et diagnostique. C'est le cas du médicament Humira®, un anticorps monoclonal dirigé contre le TNF- α , pour ne citer que lui.

Les anticorps polyclonaux sont un ensemble d'anticorps dirigés contre un même antigène mais qui reconnaissent différents épitopes. Aujourd'hui, les mélanges d'anticorps polyclonaux sont produits à partir d'animaux(33). Pour les produire, on injecte à l'animal (d'âge adulte car la production peut être moindre s'il est trop jeune) l'antigène d'intérêt, avec quelques adjuvants pour booster la réaction immunitaire. Puis on laisse le temps au lapin de récupérer et produire des anticorps spécifiques. Quelques semaines plus tard, on prélève le sang du lapin pour extraire les anticorps(85).

Les anticorps monoclonaux reconnaissent un seul et même épitope d'un antigène, contrairement aux polyclonaux. La majorité des traitements utilisant des anticorps sont des anticorps monoclonaux. Historiquement, leur production recourait à la méthode des hybridomes : fusion d'un lymphocyte B de souris avec un myélome murin. Cet hybridome était réinjecté chez la souris vivante pour qu'elle produise des quantités importantes d'anticorps. Le rejet de ces anticorps murins par l'homme (en raison de la reconnaissance des séquences murines) a entraîné le développement de méthodes alternatives, *in vitro*, basées sur l'utilisation de cellules ovariennes de hamster chinois. C'est la principale méthode utilisée aujourd'hui pour sa qualité et sa facilité d'utilisation(34).

3. Utilisation du porc en xénotransplantation

Ces dernières années, le porc est devenu un modèle animal très prisé, principalement dans le domaine de la xénotransplantation. La taille et le fonctionnement de ses

organes, surtout cardiaques et pulmonaires, sont très semblables à l'homme. Face à la pénurie d'organe humain disponible pour des transplantation, l'utilisation du porc comme alternative s'est révélée particulièrement utile.

La xénotransplantation consiste en une transplantation d'un organe provenant d'une espèce donnée à une espèce différente, dans notre cas, d'un organe de porc à un humain. Le principal problème, comme lors d'allogreffe, est celui du rejet (aigu, hyper aigu, ou chronique). Auparavant, la greffe d'un cœur de porc entraînait un rejet immédiat dans les minutes suivant l'opération, en raison de l'expression d'un motif disaccharidique bien particulier à la surface des cellules porcines. Ce motif était immédiatement reconnu par nos anticorps naturels xénogéniques(86). Une équipe de chercheur a développé en conséquence un porc transgénique qui n'exprimait pas ces sucres à la surface de ces cellules(87), permettant ainsi un allongement de la durée de vie du greffon et du receveur(88).

V. Hébergement et soins des animaux de laboratoire

Le soin des animaux de laboratoire est primordial pour toute unité de recherche car elle est garante de résultats fiables. Plusieurs guides ont été établis pour les utilisateurs d'animaux d'expérimentation afin de répondre à leurs besoins primaires et leur procurer un environnement sain selon chaque espèce. Nous nous référerons ici à « Guide for the care and Use of Laboratory Animals » rédigé par « The National Research Council ». Ce même guide fait référence à plusieurs articles/livres scientifiques et est régulièrement mis à jour.

Ce guide a pour objectif d'assister les différentes institutions de recherche dans l'hébergement et le soin des animaux par des méthodes scientifiques, techniques et humainement appropriées.

Les éléments qui vont suivre sont assez généraux et valables pour la plupart des espèces animales terrestres. Cependant, le chercheur doit se référer à des textes plus spécifiques à l'espèce qu'il utilise puisque chaque espèce est différente et a des besoins propres.

1. Environnement de vie

a. *Micro et macro-environnement*

Avant de commencer, plusieurs définitions sont nécessaires. Le micro-environnement est défini dans le guide comme « l'environnement physique situé à proximité immédiate de l'animal ». Il s'agit le plus souvent de la cage ou du box de l'animal, qui est le premier environnement en contact avec l'animal. Le macro-environnement, lui, est constitué de l'environnement secondaire, en dehors du micro-environnement. Il s'agit de la pièce dans laquelle se situe la cage, c'est tout ce qui entoure le micro-environnement. Il peut aussi d'un jardin par exemple.

Ces deux environnements s'apprécient de manière différente et sont caractérisées par des facteurs tels que l'humidité, la température, le niveau sonore, la composition de l'air, etc.



b. *Température et humidité*

Chaque espèce requiert une température et un taux d'humidité plus ou moins spécifique afin de maintenir leur température corporelle. La température optimale à proximité immédiate de l'animal est celle qui permet une thermorégulation sans avoir besoin d'augmenter la production métabolique de chaleur ou d'enclencher des

mécanismes de perte de chaleur. La zone de température optimale est appelée « Thermoneutral zone » ou TNZ. Il peut arriver que l'animal se situe en-dehors de cette zone mais cela l'oblige à se thermoréguler en changeant son comportement.

- Pour la souris, cette TNZ se situe entre 26 et 34°C(89)
- Pour le rat : 26-30°C(89)
- Pour la gerbille : 28-32°C(89)
- Pour le lapin : 15-20°C(90)
- Pour les chats et chiens : 20-25°C
- Animaux de ferme : 16-27°C

Attention au macro et au micro-environnement qui peut influencer sur cette température. Une température de 20°C dans la pièce ne signifie pas qu'il fait 20°C dans la cage de l'animal. Il faut donc également prendre en compte le matériel de construction, le matériel présent dans la cage, la ventilation, etc. Ainsi, ces zones de température décrivent surtout la température qui doit se situer autour de l'animal (et non celle de la pièce).

Le guide donne donc les températures idéales qui doivent être mesurées dans la pièce (macro-environnement) :

- Pour les rongeurs : 20-26°C
- Pour le lapin : 16-22°C
- Pour les chiens, chats et primates non humain : 18-29°C
- Pour les animaux de ferme : 16-27°C

La température en tant que telle est importante, mais il est également primordial de ne pas exposer les animaux à de grosses fluctuations de températures, même à l'intérieur de la TNZ. Cela pourrait avoir un impact négatif sur le bien-être animal, sur leur comportement et leur santé.

Certaines situations particulières nécessitent des températures différentes comme lors de la mise-bas ou en post-opératoire.

L'humidité relative doit généralement être comprise entre 30 et 70% pour la plupart des mammifères, excepté bien sûr pour certaines espèces animales (espèces

tropicales par exemple). Chez les rats, une humidité trop faible associée à une température élevée peut conduire à une nécrose de la queue(91).

De manière générale, la température et l'humidité relative sont des paramètres à prendre en compte pour fournir à l'animal un environnement à la fois sain pour sa santé physique mais aussi mentale.

Que dit la loi ? « Arrêté du 1^{er} février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles »

La loi précise les températures indiquées pour chaque espèce :

- Rongeurs : 20-24°C
- Lapin, chats, chiens : 15-21°C
- Animaux de ferme : 10-24°C

La température et l'humidité relative des locaux d'hébergement doivent être adaptées aux espèces et aux catégories d'âge hébergées et doivent être contrôlées de façon à assurer le maintien du bon état de santé de ces animaux. La température doit être mesurée et notée chaque jour.

c. *Qualité de l'air*

Une bonne ventilation est essentielle puisqu'elle permet d'avoir une bonne qualité de l'air et de réguler les deux précédents paramètres (température et humidité). Elle uniformise la température de la pièce et l'humidité en limitant les « zones » de chaleur produite par l'animal ou par les lampes. Elle évite le développement de champignons ou d'autres pathogènes présents dans l'air, ainsi que les allergènes.

Encore une fois, une bonne ventilation du macro-environnement ne garantit pas une bonne qualité de l'air du micro-environnement, cela va dépendre de l'architecture de la pièce, de la position de la ventilation, du matériau de la cage, ... Les animaleries doivent être construites de manière à ce que la ventilation ne soit pas directement en face du micro-environnement, ce qui pourrait être néfaste.

La ventilation doit permettre un renouvellement de l'air 10 à 15 fois par heure. Les systèmes de ventilation et d'air conditionné modernes permettent de contrôler de

nombreux paramètres assurant une bonne qualité de l'air, de façon automatique et pouvant s'adapter aux différentes espèces hébergées. Il existe des cages ventilées pour les animaux, mais attention à ce que la ventilation ne soit pas trop forte pour l'animal.

Que dit la loi ? « Arrêté du 1^{er} février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles »

- a) L'isolation, le chauffage et la ventilation dans les locaux d'hébergement doivent être conçus de façon à ce que la circulation de l'air, les taux de poussière et les concentrations de gaz soient maintenus dans des limites qui ne nuisent pas aux animaux
- b) Les animaux ne doivent pas être maintenus dans des aires extérieures s'il y règne des conditions climatiques potentiellement préjudiciables.

d. Luminosité

La luminosité optimale dépend de nombreux paramètres tels que le rythme biologique de l'animal, sa température corporelle, sa production hormonale, son espèce, son âge, et bien d'autres encore. Le guide cite une étude récente qui met en évidence l'importance de la luminosité pour son action sur des cellules impliquées dans la régulation neuro-comportementale, endocrine, et dans le rythme circadien(92). En effet, la luminosité et le spectre lumineux impactent directement la production de mélatonine et d'autres marqueurs biologiques.

Pour les souris, la luminosité idéale de la pièce est de 325 lux, située à 1m du sol. Cette intensité lumineuse ne provoque pas de rétinopathie phototoxique chez les rongeurs albinos, qui ont été utilisés comme modèle de base pour définir la luminosité optimale(93). Une luminosité plus élevée est possible mais des mesures de protection doivent être prises pour les rongeurs albinos. Une luminosité située en-dessous de 270 lux expose les souris à une toxicité rénale. La luminosité mesurée dans la cage, elle, ne devrait pas se situer au-dessus de 25 lux.

Que dit la loi ? « Arrêté du 1^{er} février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles »

- a) Dans les locaux où la lumière naturelle n'assure pas un cycle jour/nuit approprié, il est nécessaire de prévoir un éclairage contrôlé pour satisfaire aux besoins biologiques des animaux et pour fournir un environnement de travail satisfaisant au personnel
- b) L'éclairage doit permettre de procéder aux soins et à l'inspection des animaux
- c) Dans le cas d'un éclairage artificiel, celui-ci doit être contrôlé pour satisfaire aux exigences biologiques et comportementales des animaux, en prévoyant des photopériodes régulières et une intensité lumineuse adaptées aux espèces hébergées
- d) Lorsque des animaux albinos sont hébergés, l'éclairage doit être adapté pour tenir compte de leur sensibilité à la lumière.

e. Niveau sonore

Le niveau sonore doit être pris en compte pour le bien-être animal. De ce fait, l'animalerie doit être pensée et isolées pour minimiser la production de bruit due aux animaux eux-même, ou à leur manipulation, ou encore à l'environnement extérieur.

La séparation du laboratoire en « zones humaines » et « zones animales » permet de limiter les nuisances sonores. Les animaux plus bruyants (certaines espèces d'oiseaux, les chiens, les primates, etc.) devraient être hébergés suffisamment loin des animaux plus silencieux (rongeurs, lapins, chats). Dans la mesure du possible, les expérimentations qui peuvent être bruyantes devraient être réalisées à distance de la salle d'hébergement des animaux.

Une exposition des animaux à des sons supérieurs à 85 dB peut avoir des effets néfastes, et peut par exemple réduire la fertilité des rongeurs(94) ou augmenter la pression artérielle chez les primates non humains(95). Le bruit est source de stress pour la plupart des animaux, pouvant altérer les résultats d'une expérimentation. Par

exemple, une exposition à des bruits de 112 dB chaque jour pendant une heure et demi peut augmenter le poids des glandes surrénales des rats et des lapins, et diminuer le poids de la rate et du thymus(96). Pour les singes, les chats, les chinchillas, qui sont plus sensibles au bruit, le niveau sonore maximal devrait être de 60 dB.

Certains animaux sont également sensibles à des fréquences inaudibles pour l'homme, comme les ultrasons. Il faut ainsi prendre en compte les bruits produits par des appareils utilisés lors des expérimentations, même si l'oreille humaine n'y est pas sensible. L'idéal est de limiter autant que possible les objets pouvant être bruyant, tels que les radios, les alarmes, etc. sauf s'ils sont nécessaires à l'expérimentation.

Que dit la loi ? « Arrêté du 1^{er} février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles »

- a) Les niveaux sonores, y compris les ultrasons, ne doivent exercer aucune incidence néfaste sur le bien-être des animaux ;
- b) Les établissements doivent être équipés de systèmes d'alarme qui émettent des sons en dehors de la gamme sensibles des animaux, lorsque cela n'empêche pas qu'ils soient audibles pour les êtres humains ;
- c) Les locaux d'hébergement doivent, le cas échéant, disposer d'une isolation phonique et être équipés de matériaux absorbant les sons.

2. Hébergement

Le micro-environnement des animaux doit répondre à leurs besoins primaires : besoins physiques, physiologiques, comportementaux, et sociaux. Sans cela, les résultats obtenus lors des expérimentations peuvent être faussés. Les animaux sociaux devraient être hébergés en groupes compatibles, de taille adéquate (pas trop grand pour limiter le stress induit par une surpopulation). Il peut arriver que certains animaux sociaux soient hébergés dans une cage individuelle si c'est pour les besoins de l'expérience ou si l'animal n'est pas compatible avec le reste du groupe.

La cage doit être enrichie par divers éléments (des perches, des jeux, des structures en bois, etc.) permettant aux animaux d'exprimer leurs comportements naturels, sans que cela soit dangereux pour eux. La cage doit être fabriquée dans un matériau non toxique, facilement lavable (donc résistant aux techniques de décontamination), et ne doit pas permettre à l'animal de se blesser ou de s'échapper.

Elle doit aussi présenter les structures nécessaires pour le repos de l'animal, avec une litière adaptée. Chaque espèce a des besoins bien particuliers, c'est pourquoi les chercheurs devraient penser chaque hébergement en fonction de l'espèce choisie, afin de répondre à ses besoins spécifiques.

a. *Dimensions de la cage*

Les dimensions des cages sont données en annexe.

Que dit la loi ? « Arrêté du 1^{er} février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles »

La loi définit les dimensions des cages pour chacune des espèces, en fonction de leur taille :

- Rongeurs (figures 2 et 3) : la hauteur du compartiment est applicable pour plus de 50% de la surface minimale au sol du compartiment, avant insertion des éléments d'enrichissement. Lors de la conception des

- Lapins (figure 4) : une plate-forme doit être prévue à l'intérieur du compartiment. Elle doit permettre à l'animal de s'y étendre ou de s'y asseoir et de se déplacer facilement en dessous ; elle ne doit pas couvrir plus de 40% de l'espace au sol. S'il existe des raisons scientifiques ou vétérinaires de ne pas utiliser une plate-forme, la taille du compartiment doit être supérieure de 33% pour un lapin seul et de 60% pour deux lapins. Pour les lapins de plus de 10 semaines : la surface au sol supplémentaire est de 3000 cm² par lapin, pour le troisième, le quatrième, le cinquième, et le sixième, et de 2500 cm² au minimum pour chaque lapin supplémentaire au-delà de six.
- Chats (figure 5) : les chats ne peuvent être hébergés individuellement pendant plus de 24h d'affilée. Les chats qui se montrent souvent agressifs envers d'autres chats en doivent être isolés que s'il n'est pas possible de leur trouver un compagnon compatible. Le stress lié aux interactions sociales doit être contrôlé au moins chaque semaine chez tous les individus hébergés par paire ou en groupe. Les femelles avec des chatons de moins de quatre semaines ou dans les deux dernières semaines de gestation peuvent être hébergées individuellement. Les aires d'alimentation et celles prévues pour les bacs à litière ne doivent pas être distantes de moins de 50 cm et ne doivent jamais être mises à la place l'une de l'autre.
- Chiens (figure 6) : les chiens doivent pouvoir, dans la mesure du possible, se dépenser à l'extérieur. Les chiens ne doivent pas être hébergés individuellement pendant plus de quatre heures d'affilée. Le compartiment intérieur doit représenter au moins 50% de l'espace minimal disponible pour les chiens. Les dimensions définies dans le tableau sont indiquées pour les beagles, mais pour les autres races, l'espace nécessaire doit être déterminé en consultation avec le personnel vétérinaire.
- Primates (figure 7) : les jeunes primates ne doivent pas être séparés de leur mère avant l'âge de six à douze mois selon l'espèce. L'environnement doit permettre aux primates de se livrer quotidiennement à des activités complexes. Le compartiment doit leur

b. Types de cages(97)

Les cages doivent permettre aux animaux d'exprimer leurs comportements naturels et leur fournir un lieu sécuritaire et confortable. Elles doivent être correctement ventilées, disposer d'un système d'abreuvement et d'alimentation pour les animaux. Pour des raisons pratiques, elles doivent être simples à nettoyer et désinfecter.

Les rongeurs préfèrent généralement des cages à fond plein plutôt que grillagé, cela améliore grandement leur confort(98).

Cages rectangulaires : il s'agit de cages qu'on utilise généralement pour les petits rongeurs. Celles en polycarbonate sont particulièrement intéressantes puisqu'elles résistent à la désinfection par autoclave et aux autres produits désinfectants. Elles sont également transparentes, ce qui permet d'observer les animaux.

On peut y placer une litière de contact de type copeaux de bois, etc. pour que l'animal soit plus à l'aise et créer son micro-milieu. En revanche, l'un des inconvénients est que l'animal est en contact avec ses excréments, ce qui génère de l'ammoniac, du gaz carbonique et de l'humidité. Cela nécessite donc des nettoyages très fréquents (3 fois par semaine).



Figure 20 Exemple d'une cage rectangulaire

Grandes cages à fond plein : certains laboratoires utilisent de grands bacs plastiques remplis dans le fond de litière de contact, notamment pour des espèces comme les cobayes ou les lapins. Les angles doivent être arrondis pour le nettoyage.

Cages suspendues : ce sont des cages à fond perforé de sorte que l'animal ne soit pas en contact permanent avec ses excréments. Le fond perforé doit être pensé de manière à ne jamais blesser l'animal et à pouvoir supporter son poids. Sous ce plancher perforé se situe généralement un bac à fond plein pour pouvoir nettoyer régulièrement les besoins de l'animal.

Il existe de nombreux autres types de cage spécifiques à des besoins particuliers (comme les cages à métabolisme par exemple pour recueillir tous les excréta des animaux), que nous ne détaillerons pas ici.

3. Gestion des besoins

La satisfaction des besoins d'un animal influence directement la qualité des résultats d'une expérience. Cela passe, bien entendu, par l'hygiène générale de l'hébergement de l'animal, par son alimentation, par sa santé, mais également par son bien-être. L'hébergement de l'animal doit pouvoir lui prodiguer du confort et lui permettre d'exprimer des comportements naturels, nécessaires à son bien-être et à la limitation du stress.

Des lignes directrices existent et regroupent les éléments généraux à connaître. Ce ne sont pas des obligations, et le chercheur doit également s'adapter aux nécessités de son expérimentation, mais aussi à l'animal en lui-même. Certains animaux sont de nature sociable et devraient être hébergés en groupe d'animaux compatibles, mais il arrive parfois qu'un individu ne s'entende dans aucun groupe. Il est alors préférable, pour son bien-être et pour réduire l'anxiété liée à la cohabitation, de l'héberger seul.

a. ***Besoins comportementaux et sociaux***

Il est clair que l'animal de laboratoire ne pourra pas se dépenser physiquement et mentalement de la même façon qu'un animal sauvage. Cependant, il faut éviter les

comportements répétitifs le plus possible (stéréotypie) car ils sont signe de stress et peuvent donc avoir une répercussion sur la validité des résultats de l'étude(99). Dans la mesure du possible, il faut pouvoir fournir à l'animal un environnement qui lui permette d'exprimer ses comportements naturels (de la litière pour recréer un micro-milieu par exemple). Pour apporter à l'animal des sources diversifiées d'interactions, on a recours à l'enrichissement du milieu.

En termes de besoins sociaux, nous en avons parlé un peu plus haut, les animaux sociaux doivent être hébergés dans des groupes d'animaux compatibles. Cela génère des interactions sociales diverses et variées, nécessaires à leur bien-être. Il faut pour cela un temps d'acclimatation et certains prérequis pour que le regroupement se fasse dans de bonnes conditions(97) :

- La cage doit être suffisamment spacieuse pour que les animaux puissent maintenir une distance adéquate entre eux, puissent s'échapper en cas de conflit ou de tension.
- Il doit y avoir suffisamment de ressources (eau, nourriture) pour limiter la protection de ces dernières.
- Il faut éviter les regroupements trop fréquents d'animaux car cela génère à chaque fois des tensions le temps que les animaux se réadaptent au nouveau groupe social formé.
- La taille des groupes doit être adaptée à l'espèce en question.

Ainsi, la compatibilité du groupe devrait être régulièrement réévaluée car elle peut changer en fonction de la maturité sexuelle des individus, de la hiérarchie qui s'installe, ou bien de l'ajout d'autres individus dans le groupe.

Les interactions congénères sont un point important, mais les interactions avec les humains du laboratoire le sont tout autant(100). Elles permettent d'établir des liens entre les animaux et les humains qui les manipulent, de sorte que si ces interactions sont positives, les manipulations futures sont plus aisées et participent également au bien-être animal en limitant l'anxiété. Ceci est valable pour la plupart des animaux de laboratoire, mais certains animaux sauvages supporteront moins bien les interactions avec l'homme. Pour ces derniers, les contacts ne doivent pas être trop fréquents pour ne pas stresser l'animal inutilement.

L'enrichissement du milieu de vie de l'animal est un point central de son bien-être. Newberry définit l'enrichissement comme toute modification du milieu de vie de l'animal qui conduit à une amélioration de son fonctionnement biologique, à une amélioration de sa santé (physique et psychologique)(101). Celui-ci consiste à aménager un environnement stimulant pour l'animal, à lui créer un cadre de vie participant à son bien-être et à des besoins non essentiels (au-delà de ses simples besoins physiques de base). L'enrichissement du milieu de vie permet à l'animal d'exprimer des comportements naturels, d'avoir des activités diversifiées, et de contrôler son milieu, sans réduire la qualité des résultats de l'étude(102), bien au contraire. Cela passe par l'aménagement du milieu de vie de l'animal, en lui fournissant des surfaces adaptées (par exemple, plusieurs surfaces de hauteur différente pour les lapins, des abris ou cachettes pour les rongeurs, etc.), des matériaux de nidification (la litière permet aux rongeurs de créer un micro-milieu, de s'y cacher, de s'y reposer), en lui apportant des objets stimulants (jouets pour les chiens et chats à mâcher par exemple).

Il faudra tenir compte des besoins propres à chaque espèce, mais aussi à chaque individu qui peut réagir différemment aux enrichissements selon les expériences vécues précédemment. Des lignes directrices sont émises pour chaque espèce, mais c'est à l'équipe et au vétérinaire référent de choisir ce qui est le plus adapté. On peut évaluer la pertinence des enrichissements via des tests de préférence(103). Les animaux font en général des efforts supplémentaires pour des cages mieux adaptées, pour des matériaux de nidification plus appropriés, etc., ce qui montre qu'ils préfèrent ce type de cage(104).

Voici quelques exemples d'enrichissement selon les espèces :

- Rongeurs : la présence de matériaux de nidification est un point essentiel pour les rongeurs : cela leur permet de créer un micro-milieu, de s'y cacher, de s'y reposer, de se reproduire(103). L'absence de matériaux de nidification entraîne des comportements anxieux chez la souris notamment(105). Chez le rat, les matériaux de nidification sont plus mitigés. La création de terrier/nid n'est pas innée chez eux, ils doivent l'apprendre de leur mère(106), en conséquence de quoi, si on leur propose des mouchoirs comme matériel de nidification, ils auront tendance à le manger plutôt qu'en faire des nids. Leur donner des box (avec ou

sans matériau de nidification) sombre ou opaque sera préférable pour les rats(107). Pour les rongeurs, on peut également leur fournir des tubes en plastiques, des bâtons à ronger, etc. pour combler le besoin d'exploration et de recherche de nourriture.

- Lapins : ce sont des animaux qui ont besoin de suffisamment d'espace pour se dépenser et pour sauter (un comportement naturel chez eux), donc il est



Figure 21 Issu de V. Baumans, P.L.P. Van Loo : *How to improve housing conditions of laboratory animals: The possibilities of environmental refinement, The Veterinary Journal, Volume 195, Issue 1, 2013*

préférable de privilégier les enclos plutôt que des cages individuelles pour favoriser les contacts sociaux et leur permettre de bouger à leur guise. L'ajout de fourrage, de blocs de foin, de bâtons à mâcher, etc. est un avantage pour le bien-être de ces animaux.

- Chiens : l'hébergement en groupes sociaux ou par paire d'animaux est essentiel pour ces animaux sociaux. Il faudra néanmoins veiller à ce que chaque individu ait bien accès aux différentes ressources (nourriture, eau). Idéalement,



Figure 22 Issu de V. Baumans, P.L.P. Van Loo : *How to improve housing conditions of laboratory animals: The possibilities of environmental refinement*, *The Veterinary Journal*, Volume 195, Issue 1, 2013

les chiens préféreront une cage avec plusieurs plateformes pour pouvoir se dépenser, jouer, observer(108). On pourra leur apporter des bâtons à mâcher résistants et appétant (certains existent en matière plastique très résistante) qu'il est possible de suspendre à quelques centimètres du sol afin de limiter la production de ressource si nécessaire. Les objets ainsi que le matériel de la cage ne doivent jamais blesser l'animal.

- Chats : bien qu'ils soient des animaux plutôt solitaires, il est possible de les héberger en groupe compatible ou bien par paire. Des étages de différents niveaux devraient être aménagés pour que les chats puissent se placer en hauteur, et la présence de cachettes est vivement recommandée car elle réduit le stress des animaux(109).
- Mini pigs : ils doivent aussi être hébergés en groupes d'animaux compatibles (basés sur des liens familiaux si besoin), mais attention aux ententes entre mâles. Ils doivent avoir un accès constant au foin ou à de la paille, pour leur permettre de fouiner (une activité qu'ils pratiquent souvent pour explorer leur

- environnement et trouver de la nourriture). On peut également leur donner des jeux de type grosse balle avec un trou pour fourrer de la nourriture à l'intérieur.
- Primates non humains : ils doivent être hébergés en groupes sociaux (notamment familiaux) afin de nouer des relations spécifiques et exprimer des comportements naturels comme le toilettage inter-compagnon, les embrassades, se blottir les uns contre les autres, etc. Ces animaux passent, à leur état sauvage, beaucoup de temps à chercher de la nourriture alors qu'en captivité, celle-ci est fournie facilement. Il est donc souhaitable de complexifier cette tâche en fournissant des fruits congelés, des noix de coco intactes, des gamelles avec des casse-têtes, en cachant la nourriture, etc. Au sein de leur environnement, les singes auront besoin de pouvoir utiliser de diverses manières l'espace à leur disposition, avec des branches, des chaînes, des pneus de voiture pour se balancer par exemple.

Nous avons pu voir combien ces enrichissements peuvent être bénéfiques pour le bien-être animal, pour leur équilibre physique et mental. Mais quel est l'impact de ces enrichissements sur les résultats d'une étude ?

La qualité des résultats d'une étude dépend en partie du contrôle des différentes variables. Pour pouvoir comparer correctement deux groupes de souris, l'une soumise à un traitement et l'autre non, la seule variable qui doit différer entre ces deux groupes est l'administration ou non du traitement en question. Le reste doit être le plus identique possible afin qu'on puisse attribuer les effets observés (ou non observés) au traitement et pas à une autre variable inconnue des chercheurs. Par exemple, si la souris recevant le traitement n'a pas la même alimentation que la souris contrôle, cela va affecter les résultats : les résultats obtenus pourront être dus au traitement bien sûr, mais quelle part l'alimentation aura-t-elle joué dans cette expérience ? Pour pallier cela, on utilise la même alimentation pour le groupe contrôle que pour le groupe traité. Mais alors, si cette alimentation est de mauvaise qualité, il est encore possible qu'elle fausse les résultats obtenus dans le groupe traité en interagissant avec le traitement sans qu'on le sache.

Ainsi, le travail du chercheur est d'identifier toutes ces variables et de réduire leur impact sur les résultats. L'alimentation n'est qu'un exemple, et aujourd'hui, les

chercheurs utilisent une alimentation de qualité, exempte de pathogènes, adaptée à l'espèce utilisée, et répondant à tous ses besoins physiques.

Le bien-être animal est une de ces variables qu'il faut prendre en compte. Ce qui est certain, c'est qu'un animal en situation de stress ne présente pas les mêmes comportements, ni les mêmes réponses qu'un animal heureux(110). On sait notamment que le stress impacte la réponse immunitaire de l'animal (et de l'homme aussi !)(111–113). Il semble également important pour l'animal d'avoir un certain contrôle sur son environnement et de pouvoir agir sur la source de stress(110).

b. Besoins alimentaires

L'alimentation des animaux doit être en mesure de répondre à leurs besoins nutritionnels, et leur apporter la quantité et la qualité nécessaire en protéines, glucides, lipides, ... Elle doit être adaptée à l'espèce et au statut physiologique de l'animal (période de gestation ou de lactation, animal adulte ou non).

Elle doit faire l'objet de vérifications et d'analyse afin de s'assurer qu'elle est exempte de pathogènes. Il est préférable d'utiliser un seul fournisseur de nourriture pendant la durée d'une étude afin d'avoir des valeurs nutritionnelles constantes. Des changements dans l'approvisionnement en nourriture peuvent être source de variabilité dans les résultats de l'étude, et devraient être évités autant que possible.

Une attention particulière doit être portée à l'entreposage des aliments. Une vérification régulière de la qualité de la nourriture, notée dans un registre, doit être menée afin de s'assurer de l'absence de moisissure, de vermine, ou d'autres éléments pouvant compromettre la qualité de l'alimentation.

Chaque animal doit pouvoir accéder à la nourriture. Si, en raison de la nature de l'expérience, l'animal se nourrit moins, il devra être rigoureusement suivi et on doit faire en sorte d'adapter son alimentation (des aliments plus appétents, ou plus mous par exemple). L'alimentation peut être utilisée comme une source d'enrichissement : il est possible de l'éparpiller au sol, d'utiliser des « gamelles à énigme » (*puzzle feeders*) pour complexifier la recherche de nourriture. Il faudra cependant retirer les restes de nourriture rapidement de la cage afin que ceux-ci ne soient pas altérés par des moisissures, ou autre.

L'utilisation de distributeurs d'aliments permet généralement de conserver la nourriture de manière adéquate, et d'approvisionner sans encombre les animaux. Le distributeur doit être régulièrement contrôlé pour s'assurer de l'absence de vermine ou de moisissure. On doit également vérifier que tous les animaux ont bien accès au distributeur.

L'eau fournie aux animaux doit être potable. Cela doit être vérifié de façon régulière (une fois par an au minimum selon les recommandations), à partir de la source de l'animal. On peut utiliser un distributeur d'eau pour les animaux, mais celui-ci doit être correctement entretenu pour éviter toute contamination de l'eau. Il doit également être adapté à l'espèce animale hébergée et à son stade de développement.

4. Soins vétérinaires

a. *Contact humain et manipulation*

Le contact humain peut s'avérer bénéfique pour de nombreux animaux sociaux utilisés en recherche, à condition que ce contact soit le plus souvent positif pour l'animal. Établir une relation positive entre le chercheur et l'animal permettra de réduire le stress (de l'un et de l'autre). Ceci est valable pour la plupart des animaux, comme les rats et les souris, les chiens, les animaux de ferme, etc. Toutefois, lorsqu'il s'agit d'animaux sauvages, il peut être préférable de limiter les contacts humains au strict nécessaire. Le chercheur doit faire en sorte que chaque contact soit une expérience positive pour l'animal (renforcement positif).

Pour que la manipulation de l'animal soit une expérience positive, elle doit se faire de manière douce, calme, en adéquation avec l'espèce. Le personnel doit donc être formé correctement à la manipulation des différents animaux et au comportement de ceux-ci, afin de reconnaître les éventuels signes de stress ou de mal-être. Le renforcement positif (récompenser les comportements que l'on souhaite faire perdurer) lors de ces manipulations est vivement recommandé car il réduit le stress des animaux et du personnel. Plusieurs études démontrent l'importance d'une

période d'acclimatation où on habitue l'animal à être manipulé, à être touché, etc. pour réduire le stress des animaux(114,115).



Pour en savoir plus au sujet de la relation entre le chercheur et l'animal qu'il étudie

b. Surveillance des animaux

Les animaux doivent faire l'objet d'une surveillance régulière quant à leur santé physique et mentale dans le but d'intervenir rapidement en cas de blessure ou de maladie.

L'équipe de chercheurs, accompagnée du personnel vétérinaire de l'établissement, devra donc vérifier régulièrement :

- L'état physique général des animaux : apparence, poids, réaction aux divers stimuli, apparence du pelage, capacité à se mouvoir, ...
- Le comportement des animaux et notamment la présence de stéréotypie (comportements répétitifs synonymes de stress chronique)
- La présence d'agents pathogènes : selon l'étude en question, les chercheurs vont adapter la liste de pathogènes à surveiller. Cela peut nécessiter de réaliser des sérologies, mais il faut veiller à limiter autant que possible les procédures invasives qui ne seraient pas nécessaires.
- La cohabitation des animaux suite à des changements de groupes sociaux (introduction de nouveaux animaux, retour d'individus après une période d'isolement, ...).
- La réaction des animaux suite à des changements dans leur environnement (introduction d'enrichissement, changement de litière, changement du distributeur d'eau ou de nourriture, ...).

C'est toujours à l'équipe et au personnel vétérinaire d'adapter leur surveillance en fonction de l'étude. Certaines nécessiteront un suivi plus rapproché que d'autres, ou bien à certains moments particuliers (post-chirurgie par exemple). De même, cette surveillance doit être adaptée à l'espèce animale et à la souche utilisée : chaque animal a des besoins qui lui sont propres et ne demande pas la même surveillance.

Toutes ces informations doivent être tenues dans différents registres détaillés ci-dessous. Ceux-ci doivent être accessibles au personnel intervenant sur les animaux afin de faciliter la transmission d'informations et conserver une trace des suivis.

- Registre des animaux : consigne les animaux utilisés pour l'étude, espèce animale, souche, sexe, âge, date d'arrivée des animaux, origine, couleur de pelage, marque de distinction, autre commentaire pertinent, etc.
- Registre de soin et de gestion des animaux
 - Registre d'observation quotidienne des animaux : heure d'observation, remarques sur l'état de santé de l'animal et son bien-être (même s'il n'y a rien à signaler)
 - Registre de nourriture, d'eau, et de litière : type et quantité de nourriture fournie (quantité administrée ou à volonté), difficulté ou facilité à se nourrir, type de litière fournie.
 - Registre de nettoyage et d'assainissement : date de nettoyage, type de nettoyage effectué, type de désinfection utilisé.
 - Registre d'élevage : programme d'élevage, besoins de l'étude
 - Registre médical : soins vétérinaires
 - Registres expérimentaux : interventions chirurgicales, anesthésies, soins post-opératoires, administration d'antibiotiques, procédures expérimentales réalisées, ...
 - Registre de traitement de l'eau et de surveillance de la qualité de l'eau potable
 - Registre de surveillance de l'environnement : suivi de la température, luminosité, humidité, ...

c. Chirurgie et anesthésie

Lorsqu'une chirurgie est nécessaire, que ce soit pour les besoins de l'expérimentation ou pour traiter l'animal, elle doit être effectuée par une personne qualifiée. La personne doit avoir été formée aux techniques de chirurgie sur les animaux expérimentaux. Ainsi, un chirurgien vétérinaire expérimenté sera un atout lorsque de grosses chirurgies seront nécessaires. Il n'est pas cependant obligatoire d'être

vétérinaire pour pratiquer ces opérations dans le cadre d'expérimentation, ni d'être médecin (la formation médicale ne dispensant pas de pratique sur la chirurgie d'animaux de laboratoire). Le plus important est d'avoir du personnel formé à ce but spécifique, le temps de chirurgie et le réveil des animaux n'en sera que plus rapide.

Le chercheur devra établir un protocole précis (inscrit dans le projet expérimental préalablement validé par le comité éthique, nous en reparlons dans la partie législation) détaillant la procédure chirurgicale, le but de celle-ci, les éventuelles complications, les soins spécifiques qui en découlent, ainsi que toutes les responsabilités des personnes impliquées dans ce protocole. Tous les soins, allant du pré-opératoire au post-opératoire, devraient être réfléchis conjointement avec le vétérinaire. Il faudra également penser à une période de réadaptation après la chirurgie pour permettre à l'animal de se réhabituer (à se mouvoir notamment) et de se reposer, avant de le réintroduire dans sa cage.

Dans le cadre de ces chirurgies, une anesthésie doit être prévue, exception faite des études dont le but en interdit l'usage (étude sur la douleur notamment, mais qui ne nécessite pas toujours de chirurgie). Un paralysant musculaire ne devrait jamais être utilisé sans anesthésique associé. Le produit d'anesthésie doit être adapté à l'espèce et doit être consigné dans le registre adéquat. Le choix du produit se fait avec l'équipe de recherche et le personnel vétérinaire, d'autant plus que la plupart sont des médicaments listés sur ordonnance. D'autres médicaments peuvent être utilisés conjointement afin de réduire l'anxiété liée à la chirurgie. Les tranquillisants (benzodiazépines, phénothiazines par exemple) sont utiles pour diminuer la dose d'anesthésique utilisé. Ils produisent un effet calmant et induisent une somnolence chez l'animal.

Ce choix devra être consigné dans le projet expérimental pour validation par les autorités compétentes.

Que dit la loi ? Décret n°87-848 du 19 octobre 1987 relatif aux expériences pratiquées sur les animaux vertébrés

« Les expériences sur des animaux vivants qui peuvent entraîner des souffrances doivent être pratiquées sous anesthésie générale ou locale ou après recours à des procédés analgésiques équivalents, sauf si la pratique de l'anesthésie ou de l'analgésie est considérée comme plus traumatisante pour les animaux que l'expérience elle-même.

Lorsque les expériences sont incompatibles avec l'emploi d'anesthésiques ou d'analgésiques, leur nombre doit être réduit au strict minimum. Sauf exception justifiée, il ne peut être procédé, sans anesthésie ou analgésie, à plus d'une intervention douloureuse sur un même animal. »

d. Gestion de la douleur

La question de la douleur représente une grande thématique dans l'éthique de l'expérimentation animale. Les animaux utilisés en recherche sont des êtres sensibles, capables tout comme l'homme de ressentir de la souffrance et de la détresse. La gestion de la douleur doit être prise en compte dans chaque protocole expérimental, mais pas seulement dans les procédures en elles-mêmes, également à chaque manipulation de l'animal, lors de son transport ou de son hébergement. Elle doit être évitée chaque fois que possible, ou tout du moins soulagée lorsque cela s'avère nécessaire, lorsque cela ne va pas à l'encontre de l'objectif de l'étude (recherche sur la douleur par exemple).

Il est difficile de donner une définition claire de la douleur, tant elle diffère d'une personne à une autre, et qu'on cherche encore à en comprendre les mécanismes. Elle est définie par l'*Association Internationale pour l'étude de la douleur* comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée, ou ressemblant, à celle liée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ». Si cette définition est valable pour l'être humain, il n'y a aucune raison qu'elle ne le soit pas pour les animaux (qui ont, eux aussi, des récepteurs spécialisés dans la douleur). Cela ne signifie pas que la douleur est ressentie de la même façon, ni véhiculée par les mêmes mécanismes

biologiques, mais il est évident que les animaux sont capables de ressentir cette sensation désagréable(116) et feront beaucoup d'efforts pour l'éviter.



Pour en savoir plus au sujet de l'évaluation et de la réduction de la douleur de l'animal de laboratoire

Dans cette optique de gestion de la douleur, il est primordial que le personnel de recherche soit formé à reconnaître les signes externes de douleur et de détresse, en s'appuyant notamment sur l'expertise du personnel vétérinaire de l'établissement. Ces signes diffèrent d'une espèce à l'autre, mais en voici quelques exemples(97) :

- Primates : position courbée, absence de toilettage, refus de se nourrir ou de boire, mine abattue
- Chiens : morsures aux endroits douloureux, mobilité réduite, léchage intempestif sur l'endroit douloureux, position craintive, perte d'appétit
- Chats : posture raide, comportement insensé, absence de toilettage, tête et cou recourbés, perte d'appétit
- Souris : hérissément des poils, arrondissement du dos, absence de toilettage, isolement, refus de se nourrir et de boire
- Rats : vocalisations, léchage, refus de s'alimenter et de boire, état d'alerte, diminution des comportements d'exploration, hérissément de poils, position arrondie
- Lapins : refus de s'alimenter et de boire, restriction des déplacements, photosensibilité apparente, écoulement oculaire, tête tournée vers l'arrière de la cage
- Poissons : les poissons montrent très rarement des signes visibles de stress et de douleur, même lorsqu'ils sont très blessés. Lorsque leur milieu n'est pas approprié, ils ont des comportements aberrants à la nage, cherchent à sortir de l'eau, leur couleur est plus foncée, et ils ont des mouvements operculaires plus rapides.

La question est maintenant de savoir comment soulager cette douleur. Dans un premier temps, il faut pouvoir l'éviter lorsque cela est possible, en manipulant l'animal avec douceur, en le sédant lors d'interventions invasives, en lui fournissant un environnement adapté à son espèce et sûr pour lui. Si malgré tout, l'animal présente des signaux douloureux (liés ou non à l'étude), on aura recours à des analgésiques pour le soulager, tant que cela n'affecte pas les résultats : morphiniques, anti-inflammatoires non stéroïdiens (piroxicam, naproxène, ...), anesthésiques locaux.

e. *Euthanasie*

L'euthanasie fait référence à une « mort douce », éthiquement acceptable. Il s'agit d'une mise à mort avec le moins de douleur et de détresse possible. En recherche animale, elle peut avoir lieu pour différentes raisons : récupération d'échantillons de tissus et de sang pour analyse, obtention de cellules ou de tissus pour les tests *in vitro*, lorsque la douleur devient intolérable et inévitable, mais aussi en fin de procédure lorsque les animaux ne peuvent plus être réutilisés ou que leur qualité de vie sera trop fortement impactée. En Europe, une grande partie des animaux qui sont euthanasiés le sont en « dehors des procédures expérimentales »(117), c'est-à-dire pour le prélèvement d'organes et de tissus à destination de la recherche *in vitro* ou dans le cadre de l'élevage d'animaux de recherche (âge trop avancé, pathologie, risque de contagion).

Quelle qu'en soit la raison, la méthode utilisée pour euthanasier l'animal doit permettre d'inactiver rapidement le système nerveux central pour éviter toute sensation de douleur. Les comités éthiques ont la charge de valider la pertinence du procédé choisi.

Pour le Conseil Canadien de Protection des Animaux, « l'euthanasie devrait provoquer une perte de conscience rapide, suivie d'un arrêt cardiaque et d'un arrêt respiratoire et ultimement d'une perte totale de la fonction cérébrale. L'euthanasie devrait viser une réduction maximale de toute douleur ou détresse ressentie par l'animal avant la perte de connaissance. Au besoin, la contention devrait être utilisée de façon à ce que la douleur ou la détresse associée au processus dans son ensemble soit réduite au minimum. »

Les lignes directrices recommandent de limiter les signaux d'alarme que pourraient ressentir les animaux à l'approche de leur euthanasie, et si possible, les groupes d'animaux sociaux devraient être euthanasiés ensemble car l'isolement serait source de stress pour eux. La personne effectuant la procédure de mise à mort doit avoir été correctement formée aux méthodes pratiquées. Elle doit toujours être consentante, étant donné l'impact que cet acte peut avoir sur le plan psychologique.

Quelles méthodes doivent être utilisées ? L'*American Veterinary Medical Association* a publié un rapport de recommandations au sujet de l'euthanasie des animaux(118), détaillant les différentes méthodes d'euthanasie acceptables pour chaque espèce animale. Une section toute particulière est consacrée à l'euthanasie des animaux de laboratoire, puisqu'en plus des exigences éthiques auxquelles elle doit faire face, elle doit également être cohérente avec l'objectif de l'étude en cours. En effet, certaines méthodes d'euthanasie peuvent interférer avec les résultats. Par exemple, l'utilisation d'isoflurane peut augmenter la glycémie(119) et l'inhalation de CO₂ augmente les taux sériques de potassium de la souris(120). Peu importe la méthode utilisée, il convient toujours de confirmer la mort de l'animal.

Que dit la loi ? Directive 2010/63/UE relative aux Méthodes de mise à mort des animaux (Annexe IV)

« La mise à mort des animaux s'accompagne d'une des méthodes suivantes : confirmation de l'arrêt permanent de la circulation, destruction du cerveau, dislocation du cou, exsanguination, ou confirmation d'un début de rigidité cadavérique. »

- Pour les rongeurs et autres petits animaux de laboratoire : il faut limiter les sources de stress autour de l'euthanasie (comme le transport, la manipulation, ou les changements dans les groupes sociaux). Les rongeurs peuvent émettre des vocalisations et des phéromones lorsqu'ils sont stressés, et cela peut alerter leurs congénères. Il est donc préférable de réaliser l'euthanasie dans un local bien distinct de l'hébergement.
 - o Barbituriques : l'injection de barbiturique à 3 fois la dose utilisée pour l'anesthésie, est un moyen rapide et relativement doux d'induire une perte de conscience. C'est le pentobarbital qui est le plus souvent utilisé.

L'injection intra-péritonéale peut être douloureuse mais elle peut être diminuée par l'association d'un anesthésique local(121).

- Utilisation d'agent dissociatifs : ces agents (comme la kétamine) doivent être utilisés avec des benzodiazépines (diazépam par exemple).
- Agents inhalés : cette méthode consiste à faire respirer une surdose d'un agent anesthésique à l'animal afin d'induire une perte de conscience. Elle n'induit pas une mort immédiate donc il est recommandé de recourir à une seconde méthode de mise à mort une fois l'animal inconscient. Cette méthode n'est pas appropriée pour les espèces qui retiennent leur souffle ou pour les espèces aquatiques. On utilise généralement de l'halothane, de l'isoflurane, ou du CO₂. Le CO et le NO sont moins utilisés car ils sont moins bien tolérés. Le NO ne devrait jamais être utilisé seul car il est trop long à agir.
- Tribromoéthanol : il ne devrait être utilisé que comme un anesthésique avant une seconde méthode de mise à mort.
- Ethanol : cela consiste en une injection d'éthanol à 70-100% en intra-péritonéal, induisant un arrêt cardiaque et respiratoire, puis une mort en 2 à 4 minutes. Cette méthode peut être utile si on ne souhaite pas recourir à des méthodes physiques (voir après) et si les autres agents d'euthanasie ne sont pas possibles. Elle ne devrait pas être utilisée chez le rat (volume à injecter trop important) ni chez les souris de moins de 35 jours (trop long à agir).
- Méthodes physiques : il s'agit de la dislocation cervicale ou de la décapitation. Ce sont des méthodes fréquemment utilisées en laboratoire car elles permettent une perte des fonctions corticales en quelques secondes(122,123) et une conservation intacte des tissus. La dislocation cervicale doit être pratiquée sur des animaux en-dessous de 200g. Pour la décapitation, il existe des guillotines spécifiques pour les rongeurs dont les lames doivent être correctement entretenues. Le personnel devrait être entraîné à cet acte, en utilisant des animaux anesthésiés ou déjà morts.

Que dit la loi ? Directive 2010/63/UE relative aux Méthodes de mise à mort des animaux (Annexe IV)

Pour les rongeurs, sont acceptés :

- La surdose d'anesthésique (avec une sédation préalable de l'animal)
- Le dioxyde de carbone (à n'utiliser que par augmentation progressive de la concentration. A ne pas utiliser sur les fœtus ou nouveau-nés de rongeurs)
- La dislocation cervicale (à n'utiliser que sur les rongeurs d'un poids inférieur à 1 kg. Les rongeurs pesant plus de 150 g sont soumis à sédation)
- La commotion/percussion de la boîte crânienne (à n'utiliser que sur les rongeurs d'un poids inférieur à 1 kg)
- La décapitation (à n'utiliser qu'en cas d'impossibilité d'utiliser d'autres méthodes)

- Animaux de ferme, chiens, chats, furets, primates non humains : le plus souvent, on utilise une sédation suivie d'une injection de barbiturique, ou éventuellement d'une injection de tributame si on ne peut pas utiliser de

Que dit la loi ? Directive 2010/63/UE relative aux Méthodes de mise à mort des animaux (Annexe IV)

Pour les chiens, chats, furets, renards, sont acceptés :

- La surdose d'anesthésique (avec une sédation préalable de l'animal)
- La commotion/percussion de la boîte crânienne (à ne pratiquer que sur des nouveau-nés)
- L'étourdissement électrique (requiert un équipement spécial)
- L'abattage par balle au moyen de fusils, d'armes à feu et de munitions appropriées (à ne pratiquer que sur le terrain, par un tireur expérimenté, en cas d'impossibilité d'utiliser d'autres méthodes)

Pour les grands mammifères, sont acceptés :

- La surdose d'anesthésique (avec une sédation préalable de l'animal)
- La commotion/percussion de la boîte crânienne (à ne pratiquer que sur des nouveau-nés)
- L'étourdissement électrique (requiert un équipement spécial)
- Les gaz inertes (Ar, N₂)
- L'abattage par balle au moyen de fusils, d'armes à feu et de munitions appropriées (à ne pratiquer que sur le terrain, par un tireur expérimenté)

Pour les primates non humains, est accepté :

- La surdose d'anesthésique (avec une sédation préalable de l'animal)

barbiturique. La méthode d'euthanasie doit être conforme à l'objectif de recherche, et si l'équipe n'est pas familière avec l'espèce en question, elle peut se rapprocher de personnes qualifiées pour avoir des recommandations.

- Lapins : de la même façon, on a souvent recours à l'injection de barbiturique en intraveineux (si l'animal est habitué à être manipulé). Comme pour les rongeurs, on peut éventuellement utiliser la voie intramusculaire pour l'injection, mais il faudrait dans ce cas injecter simultanément des anesthésiques locaux ou des anticonvulsivants pour maîtriser la douleur. Il est également possible d'utiliser des anesthésiques inhalés (halothane, isoflurane, sevoflurane), mais il faut pré-anesthésier l'animal pour éviter tout stress et pour éviter que l'animal ne retienne sa respiration(124). Enfin, il est acceptable d'utiliser la dislocation cervicale pour le lapin, mais uniquement si l'opérateur est bien formé à cette pratique (plus délicate sur un aussi gros animal comparé à une souris).

Que dit la loi ? Directive 2010/63/UE relative aux Méthodes de mise à mort des animaux (Annexe IV)

Pour les lapins, sont acceptés :

- La surdose d'anesthésique (avec une sédation préalable de l'animal)
- La dislocation cervicale (à n'utiliser que sur les lapins d'un poids inférieur à 1 kg. Les lapins pesant plus de 150 g sont soumis à sédation)
- La commotion/percussion de la boîte crânienne (à n'utiliser que sur les lapins d'un poids inférieur à 5 kg)
- L'étourdissement électrique (requiert un équipement spécial)

- Poissons, amphibiens, reptiles : l'euthanasie de ce type d'animal est plus complexe car leur utilisation se fait généralement en grand nombre et qu'il

Que dit la loi ? Directive 2010/63/UE relative aux Méthodes de mise à mort des animaux (Annexe IV)

Pour les poissons, amphibiens, et reptiles, sont acceptés :

- La surdose d'anesthésique (avec une sédation préalable de l'animal)
- La tige perforante (à n'utiliser que sur les grands reptiles)
- L'étourdissement électrique (requiert un équipement spécial, et uniquement pour poissons et amphibiens)
- L'abattage par balle au moyen de fusils, d'armes à feu et de munitions appropriées (uniquement pour les reptiles, à ne pratiquer que sur le terrain par un tireur expérimenté).

existe une grande variété d'espèces utilisées, avec des caractéristiques physiologiques propres. Le refroidissement rapide dans une eau à 2-4°C induit très rapidement un arrêt des signes vitaux chez le zebra fish (*Danio rerio*), c'est la méthode de choix pour avoir une mort rapide(125). Pour les amphibiens, le rapport de l'AVMA recommande d'utiliser une méthode physique après avoir anesthésié l'animal.

VI. Les limites de l'expérimentation animale

1. Transposition

Chaque modèle a ses propres limites. En avoir conscience permet de mieux appréhender les données obtenues grâce à eux. La limite commune à tous les modèles animaux, c'est la transposition à l'homme. Or, même l'animal le plus proche génétiquement de nous aura des différences essentielles : c'est ce qui fait que nous appartenons à des espèces bien distinctes. Penser que toutes les observations faites chez l'animal peuvent se transposer sans difficulté à l'homme est une erreur.

Alors, les études animales ont-elles une valeur prédictive suffisante ? Les résultats obtenus lors des études animales peuvent-elles être extrapolées à l'homme ? De plus en plus de scientifiques (et d'autorités) s'intéressent à cette question.

On a pu se rendre compte que dans certains cas, les résultats des essais cliniques n'étaient pas concordants avec les résultats des études animales(126,127). Autrement dit, la prédictibilité des résultats obtenus lors des études animales n'est pas systématique. Il arrive également que les études animales suggèrent un certain bénéfice alors que les essais cliniques qui en découlent montrent une aggravation de la mortalité (ce fut le cas pour l'étude des corticostéroïdes dans le traumatisme crânien(126)). En réalité, le pourcentage de candidats médicaments qui passe avec succès les essais cliniques est très faible. On estime à 89% le pourcentage de candidats médicaments qui échouent lors des essais cliniques (128). 30% échoueraient en raison d'une inefficacité et 30 autres % en raison d'une toxicité trop importante(8,129). Un article du *National Institute of Health* estime que 80% des médicaments efficaces chez la souris ne le sont pas chez l'homme(8) et de nombreuses autres études remettent en

question la valeur prédictive de l'expérimentation animale(130–132). La principale raison expliquant ce phénomène est la qualité méthodologique des études précliniques jugée trop faible pour fournir des résultats fiables. Il y a trop souvent des biais dans les études animales(133) :

- Biais méthodologiques : manque de randomisation, pas de communication sur le nombre d'animaux dans certains groupes de l'étude, sortie d'animaux de l'étude inexplicée, quels éléments ont conduit à définir le nombre d'animaux minimal pour l'étude, ...
- Manque de reproductibilité et tendance à ne pas publier les résultats « négatifs » : les expériences menées sur les animaux ne sont pas suffisamment reproductibles (on n'obtiendrait pas les mêmes résultats en réitérant l'expérience décrite dans l'article publié). Il y a également une tendance à ne pas publier lorsque les résultats obtenus lors des études animales ne sont pas ceux espérés. Or, l'issue des résultats ne devrait pas influencer la décision de publier ou non, toutes les données sont nécessaires.
- Manque de revue systématique : les revues systématiques sont chargées de synthétiser toutes les données actuelles sur une question donnée (elles ont plus de poids puisqu'elles regroupent de nombreuses études et analysent leurs données). Il n'en existe pas assez en recherche animale. Or, plus de revues systématiques permettrait de mieux évaluer la pertinence des recherches animales.
- Manque de transparence sur les tests animaux : il n'existe aucun registre regroupant tous les essais sur animaux (comme on le fait pour les essais cliniques notamment). Un tel registre permettrait de mettre en commun les résultats (positifs ou négatifs) des recherches animales, que chaque chercheur pourrait consulter avant de planifier son protocole expérimental.

Force est de constater que le modèle animal n'est pas le reflet parfait de l'organisme humain. Les expériences réalisées *in vivo* ne doivent pas être considérées comme absolument prédictibles de l'homme. Il est certain que des efforts doivent être faits pour améliorer la qualité des essais précliniques et pour améliorer le bien-être animal (il n'est que rarement précisé dans les articles les mesures prises pour le bien-être

animal, alors que nous avons vu plus haut l'impact que cela pouvait avoir sur la qualité des résultats), car il me semble que ces deux notions vont de pair.

Il faut être conscient de tous ces biais pour élaborer un protocole expérimental qui soit pertinent et interpréter au mieux les résultats obtenus. En recherche médicale, obtenir un maximum de données est crucial. Une donnée fiable à 90% n'est pas fautive pour autant : elle est à prendre dans son contexte pour en tirer le meilleur parti. Il faut tenir compte des 10% de marge d'erreur pour mieux exploiter les 90% restants.

Connaître les limites des modèles animaux apporte d'autres points de vue et d'autres interprétations des résultats. On sait que certaines souches de souris sont beaucoup plus sensibles aux tumeurs que l'homme : un résultat positif à un test de cancérogénicité chez cette souche ne signifie pas forcément que le médicament sera cancérogène chez l'homme. Si nous ne savions pas les différences que cette souche a avec l'homme, nous pourrions tout de suite écarter le médicament. Or, en sachant cela, on va mener d'autres investigations pour vérifier si le médicament l'est bel et bien. Inversement, on sait que certains animaux ne présentent pas les mêmes pathologies que chez l'homme : on va alors chercher à savoir pourquoi ils ne développent pas telle ou telle pathologie, ce qui nous amène à découvrir d'autres choses qui peuvent être une piste pour une stratégie thérapeutique. Il faut avoir conscience que le modèle animal ne reproduit en général qu'une partie de la maladie choisie, principalement au niveau du mécanisme pathologique, mais les symptômes, les réactions, etc. ne sont pas forcément les mêmes que chez l'homme. C'est en comprenant toutes les sources de différence entre le modèle animal et l'homme qu'on pourra choisir le modèle animal adéquat et avoir des données de bonne qualité.

2. Coût

Le coût de développement d'un seul médicament était estimé à environ 1 milliard de dollars(69,70), selon une étude menée en 2012. Depuis, les dépenses de recherche et développement continuent d'augmenter, avec un coût moyen de 3 à 4 milliards par molécule(134), à cause de plusieurs facteurs : une exigence grandissante en termes de réglementation, un taux d'échec plus élevé des candidats franchissant le cap des essais cliniques, et un allongement de la durée nécessaire au développement du médicament.

Les essais cliniques sont la partie la plus coûteuse de ce processus (de 20 à 80 millions de dollars aux Etats-Unis selon l'aire thérapeutique(135)), mais les études précliniques ne sont pas en reste. Le coût d'une seule souris ou d'un seul rat peut varier de quelques dizaines de dollars à plusieurs centaines selon le modèle sélectionné. Cela représente un coût non négligeable étant donné le nombre d'animaux nécessaires aux études précliniques. Par exemple, le test de cancérogénicité pourrait coûter jusqu'à 700 000 \$(136,137) car il nécessite de suivre les animaux sur une très longue période.

VII. Les méthodes alternatives à l'expérimentation animale

On définit les méthodes alternatives comme des méthodes qui permettent de remplacer l'utilisation d'animaux lors des procédures scientifiques (alternative de remplacement), ou bien de réduire leur utilisation (alternative de réduction), ou encore de réduire la douleur et la détresse liées à la procédure (alternative de raffinement).

Le but de cette partie n'est pas de dresser une liste exhaustive de toutes les méthodes alternatives existantes mais de présenter les principales alternatives couramment utilisées, et souvent validées par les autorités.



Pour en savoir plus au sujet des méthodes alternatives à l'expérimentation animale en France

1. Ex vivo

Les méthodes *ex vivo* basent leurs expériences sur des tissus humains (prélevés lors de certaines chirurgies par exemple) ou des tissus animaux (provenant soit de laboratoires spécialisés, soit d'abattoir). Ces méthodes ne se substituent pas complètement à l'utilisation d'animaux puisqu'il faut la plupart du temps sacrifier un animal pour obtenir ses tissus. Elle permet cependant une réduction de l'utilisation des animaux en remplaçant la réalisation d'un test *in vivo* (donc nécessitant un animal vivant).

Les lignes directrices de l'OCDE (tests recommandés pour la constitution du dossier d'AMM) valident certaines méthodes *ex vivo*, comme l'Essai n°437 pour l'identification

des produits chimiques provoquant des lésions oculaires. Le produit chimique est testé sur une cornée bovine sur laquelle on mesure l'opacité et la perméabilité provoquée par le produit (signes toxiques). Cette méthode seule ne permet pas de remplacer le test de Draize, initialement utilisé sur des lapins vivants pour tester le potentiel d'irritation oculaire d'un produit(138). En revanche, l'OCDE propose une série de tests *in vitro* et *ex vivo* (dont l'essai n°437) qui permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire sans avoir recours à l'expérimentation animale(139).

2. In vitro

Les méthodes *in vitro* sont très nombreuses et relèvent de différentes approches, parmi lesquelles :

- Méthodes *in chemico* : elles reposent sur l'étude des propriétés physico-chimiques du produit d'essai. Le test n°442C de l'OCDE permet ainsi d'évaluer la sensibilité cutanée d'un produit en le mettant en contact avec un modèle peptidique de synthèse : le taux de déplétion des acides aminés du modèle peptidique sert à déterminer le taux de réactivité cutanée(140). Initialement, la sensibilité cutanée était testée *in vivo*.
- Méthodes utilisant des bactéries ou des levures : nous en avons vu un exemple plus haut dans la partie « étude de génotoxicité ». L'essai n°471 de l'OCDE permet d'évaluer le potentiel mutagène en utilisant la bactérie *Salmonella typhimurium*.
- Méthodes utilisant des modèles cellulaires : il s'agit généralement de lignées cellulaires humaines qui ont été rendues immortelles (elles proviennent souvent de cellules tumorales). Parmi elles, il y a la lignée d'hépatocytes humains qu'on utilise pour évaluer la toxicité des produits. Les lignées ne remplacent généralement pas les tests *in vivo*, mais permettent d'obtenir des données préliminaires pour orienter au mieux les tests sur animaux et ainsi limiter leur utilisation.
- Méthodes en immunotoxicologie : elles utilisent des cellules du système immunitaire pour définir d'éventuels effets immunosuppresseurs ou immunoactivateurs, en les mettant en contact avec la substance d'intérêt.

- Méthodes se basant sur des modèles de tissus reconstruit tridimensionnel : le principe est de reconstituer un tissu à partir de prélèvements humains, pour avoir un modèle plus complexe et plus proche d'un organisme entier que des lignées cellulaires.

Que ce soit les méthodes *ex vivo* ou *in vitro*, elles n'ont pas les avantages d'un modèle entier car ce sont des structures isolées (cellules ou tissus), qui ne simulent pas les nombreuses interactions complexes du corps humain ou animal. Cependant, nombre d'entre elles ont permis de réduire le recours aux animaux, en apportant des données préliminaires, principalement lors de l'étape de screening (avant d'avoir un candidat médicament), ou bien lors des tests réglementaires. Lorsqu'elles sont réalisées sur des cellules ou tissus humains, elles ont même une spécificité supérieure aux modèles animaux puisqu'on s'affranchit de la barrière inter-espèce. L'atout des méthodes *in vitro* et *ex vivo* se situe dans leur complémentarité : un essai seul n'est pas suffisamment prédictif, mais un ensemble d'essais coordonnés permettra d'accumuler suffisamment d'informations pour prédire certains paramètres de la substance d'essai (sensibilité cutanée, irritation oculaire, génotoxicité, étude du mécanisme d'action, potentiel inflammatoire, activité hormonale, ...). Une fois ces données connues, il est possible de planifier un protocole expérimental sur animal beaucoup plus efficace et de limiter ainsi le nombre d'animaux utilisés.

3. *In silico*

Les modèles *in silico* sont des modèles biomathématiques issus de toutes les données qu'on a pu obtenir par le biais des expérimentations *in vivo* ou *in vitro*.

- Modèles QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) : ils regroupent un grand nombre de données relatives à la relation structure-toxicité des molécules. En comparant la structure d'une substance d'essai avec des molécules toxiques déjà connues, ce modèle permet de prédire la toxicité d'un nouveau produit de manière qualitative (quel type de toxicité) et de manière quantitative (peu ou fortement toxique). Ces modèles sont complémentaires des autres méthodes expérimentales (et peuvent orienter les recherches sur la

toxicité), leurs données s'ajoutant à celles issues des tests in vitro, mais elles sont dépendantes des expérimentations sur lesquelles elles se basent. De plus, aucune similarité avec des molécules toxiques connues n'est pas synonyme d'une absence de toxicité.

- Modèles PBPK (Physiologically Based Pharmacokinetic) : ils sont utilisés en toxicocinétique pour prédire l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'élimination des produits d'essai. Ils intègrent les différents compartiments physiologiques du corps humain et simulent les échanges entre ces compartiments en se basant sur les données obtenues à partir d'expérimentation in vitro ou des modèles QSAR.

Il existe de nombreuses autres alternatives à l'expérimentation animale en plein essor (organoïdes, techniques « omics », utilisation de cellules souches), qui permettront à l'avenir de diminuer le recours aux animaux. Il est nécessaire de continuer les efforts menés pour valider plus de tests alternatifs, malgré les difficultés que cela représente (la méthode alternative doit pouvoir être spécifique de l'effet toxique, et suffisamment prédictive). En complément de ces méthodes, d'autres axes d'amélioration existent pour diminuer l'utilisation d'animaux lors des procédures expérimentales : des outils statistiques plus performants, l'amélioration de la reproductibilité des études, l'utilisation d'approches intégrées (stratégies d'action), ...



**Pour en savoir plus au sujet du Prix de Biologie Alfred Kastler
récompensant le développement de méthode alternative**

VIII. La retraite des animaux de laboratoire

1. Devenir des animaux

Bien que la législation prévoie la possibilité pour les animaux de laboratoire d'avoir le droit à une retraite bien méritée, la grande majorité des animaux qui ne peuvent être réutilisés selon les classes de protocole, est euthanasiée en fin de protocole. Il existe plusieurs raisons à cela, la première étant que l'euthanasie est nécessaire et prévue dans le protocole (pour collecter des échantillons par exemple, cela fait partie de

l'expérimentation). Mais outre les animaux euthanasiés dans un but scientifique, les autres animaux le sont généralement pour des raisons pratiques et économiques : garder des animaux qui ne sont plus utilisés coûte de l'argent, du temps, et de la place. Il y a probablement aussi un manque d'information sur la possibilité de réhabilitation. Toutes les équipes de recherche ne sont pas au fait d'une alternative à l'euthanasie : proposer aux animaux une seconde vie après leur utilisation.

Globalement, il y a 3 possibilités pour un animal utilisé en fin de protocole :

- Réutilisation dans un autre protocole de recherche lorsque l'animal n'a participé qu'à des classes de protocole de sévérité légère ou modérée
- Euthanasie lorsque l'animal ne peut pas être réutilisé
- Réhabilitation : mise à l'adoption des animaux selon certaines conditions prévues par la loi

2. Réhabilitation des animaux

La législation n'impose en aucun cas l'euthanasie en fin d'études (et ne l'interdit pas non plus), mais permet une alternative : la mise à l'adoption des animaux qui remplissent des conditions précises. Un animal de laboratoire peut être réhabilité s'il remplit ces 3 conditions :

- Être en bonne santé
- Ne présenter aucun risque pour l'environnement ou pour l'homme : cela inclut le fait de ne pas transmettre de maladie aux autres animaux ou bien à l'homme, de ne pas présenter de risque pour la faune et la flore, etc.
- Être sociabilisé : cette condition n'est pas formelle, elle est préférable en vue de l'adoption de certains animaux. Généralement, les animaux de laboratoire sont bien habitués à l'homme et souvent à leurs congénères également.

Il n'y a aucune condition concernant l'espèce animale, toutes les espèces peuvent être réhabilitées que ça soit des chiens ou bien des cochons, ou encore des primates. Il n'y a pas non plus d'âge limite !

En France, la réhabilitation des animaux issus de laboratoire est assurée par deux principales associations : le Graal (Groupement de Réflexion et d'Action pour l'Animal) et White Rabbit (qui se charge plus spécifiquement de la réhabilitation de

rongeurs). Ces associations de bénévoles se chargent d'organiser la réhabilitation des animaux sur la base du volontariat des laboratoires qui les contactent.

a. Démarche de réhabilitation

Celle-ci se déroule en plusieurs étapes.

La première s'effectue lorsqu'un laboratoire souhaite mettre à l'adoption des animaux en fin de protocole. Cette volonté vient généralement de l'équipe de recherche qui utilise les animaux au quotidien, avec l'accord de leur hiérarchie. Elle peut également être promue au sein d'un laboratoire par les services vétérinaires (en charge du bien-être animal) et par les comités éthiques. L'équipe de recherche choisit les animaux qu'elle souhaite réhabiliter : ils doivent bien évidemment remplir les conditions précédemment énoncées. Ils contactent ensuite le Graal ou bien White Rabbit. Un contrat de partenariat entre le laboratoire et le Graal doit être signé pour toute démarche de réhabilitation. Ce contrat énonce notamment les devoirs du Graal en termes de confidentialité mais également l'engagement du laboratoire pour la réhabilitation.

Lorsque l'association reçoit la demande de réhabilitation des animaux, plusieurs informations lui sont nécessaires : le nombre d'animaux, le sexe, l'âge, l'espèce, la stérilisation ou non, etc. L'équipe de bénévoles se charge ensuite de trouver une place à ces animaux auprès de refuges partenaires présents dans toute la France. Ces refuges sont bien souvent d'autres associations comme les refuges de la Société Protectrice des Animaux, ou d'autres sanctuaires dédiés aux animaux, qui ont signé un contrat de partenariat avec le Graal (ce contrat encadre juridiquement le lien entre le refuge et le Graal et garantit la confidentialité du laboratoire). Pour les animaux sauvages, c'est généralement au Zoo La Tanière que le Graal fait appel et qui a toujours participé avec générosité aux sauvetages d'animaux issus de laboratoire lorsque cela était possible. De nombreux primates ont notamment pu être réhabilités grâce à eux. Bien entendu, les animaux sauvages comme les primates ne sont pas destinés à l'adoption, au contraire des animaux domestiques comme les chiens, chats, etc. Selon le nombre d'animaux placés, l'équipe doit trouver un ou plusieurs refuges pour accueillir les animaux dans de bonnes conditions. Les refuges sont choisis en

fonction de la distance vis-à-vis du laboratoire pour limiter le stress du transport lorsque cela est possible.

Une fois les refuges trouvés, le Graal envoie les coordonnées de ces derniers au laboratoire afin que celui-ci s'organise pour le transport des animaux. Le transport est à la charge du laboratoire, et le Graal sollicite un don estimatif selon les animaux réhabilités. Ces dons garantissent la pérennité de l'action du Graal et permettent, entre autres, de financer des structures adéquates aux refuges partenaires.

Le laboratoire s'organise alors pour réserver des transporteurs agréés qui amèneront les animaux en provenance du laboratoire jusqu'à leur refuge.

D'un point de vue administratif, la réhabilitation nécessite que plusieurs documents soient réalisés et signés par les autorités compétentes :

- Un contrat d'application est signé par le laboratoire pour chaque réhabilitation : celui-ci détaille les animaux, les espèces, le nombre, le sexe, l'âge, etc. des animaux que le laboratoire souhaite réhabiliter et chez quel refuge iront ces animaux.
- Des fiches de traçabilité : il y en a une pour chaque animal réhabilité. Elles sont remplies de façon anonyme par le laboratoire et sont destinées à informer le refuge des tests subis par les animaux, ainsi que différentes informations médicales.
- Le certificat vétérinaire de bonne santé : celui-ci est établi par le vétérinaire du laboratoire et garantit la bonne santé des animaux, et qu'ils ne présentent aucun risque pour l'homme ou les animaux en contact.
- L'autorisation de la Direction Départementale de Protection des Populations : il est obligatoire d'obtenir l'autorisation de la DDPP du lieu de départ des animaux, ainsi que celle du lieu d'arrivée des animaux. Cet organisme gouvernemental autorise le placement des animaux s'ils ne présentent pas de danger pour l'homme ou l'environnement.
- La fiche de cession : elle permet la cession des animaux du laboratoire vers le Graal et ensuite vers le refuge (pour les animaux domestiques, cela passe par l'I-CAD).

Les animaux sont alors transportés jusqu'au refuge à une date prédéfinie par les deux parties. Le refuge s'engage à donner régulièrement des nouvelles des animaux

nouvellement réhabilités et à sélectionner aussi bien que possible leur futur adoptant. De manière générale, le refuge n'est jamais au courant de quel laboratoire proviennent les animaux. S'ils le sont, ils sont tenus à la confidentialité par le contrat cadre. Ils ne peuvent également s'opposer de façon frontale et extrême à l'expérimentation animale sur les réseaux sociaux, ou sur d'autres supports. Cette dernière exigence a son importance afin de conserver la relation de confiance entre les laboratoires et le Graal.

b. Les refuges partenaires

L'action du Graal ne serait pas possible sans le soutien des refuges qui se proposent pour accueillir les animaux de laboratoire. L'association a développé depuis 2005 un réseau de refuges partenaires sur qui elle peut compter lorsqu'une réhabilitation se présente.

Aujourd'hui, elle compte plus de 130 refuges(141) qui accueillent, selon les refuges, des chiens, des chats, ou des animaux de ferme. Certains proposent les animaux à l'adoption, d'autres les gardent à vie. Chaque refuge est caractérisé par son professionnalisme et s'engage à ne pas s'opposer de façon virulente à l'expérimentation animale. Tous sont dévoués à la cause animale et s'efforcent d'offrir le meilleur aux animaux qu'ils accueillent.

c. Les laboratoires partenaires

Depuis le début de l'action du Graal, l'association a développé des relations avec de nombreux grands laboratoires dont les noms ne pourront bien évidemment pas être cités dans cette thèse pour des raisons de confidentialité. Cependant, l'association travaille aujourd'hui avec plusieurs laboratoires (environ 80 unités de recherche(142)), que ça soit des laboratoires pour le développement de médicament humain ou vétérinaire, ou bien des unités de recherche publiques, ou encore des écoles vétérinaires. Les laboratoires peuvent compter sur l'entière confidentialité de la part des bénévoles, le principe étant d'établir une relation de confiance afin de garantir le placement futur d'animaux.

Une des actions du Graal est justement de promouvoir sa démarche auprès des laboratoires. Pour cela, les bénévoles démarchent parfois les laboratoires pour se faire connaître et proposer une alternative à l'euthanasie des animaux en fin de protocole. Le Graal a pour cela le soutien du ministère de la Recherche, de l'Afstal, etc. et de nombreux autres organismes gouvernementaux.

IX. Réflexion éthique

1. Règle des 3R

Cette règle est issue de la réflexion de William Russel et Rex Burch en 1959. C'est ce principe, expliqué dans leur ouvrage « The principles of humane experimental technique », qui est intégré à la réglementation européenne et française.

→ **Réduire** : c'est le premier objectif, visant à diminuer le nombre d'animaux utilisés dans les expérimentations. Le nombre d'animaux utilisé doit être réduit au minimum, mais il doit rester suffisant pour obtenir des résultats de qualité (sans quoi, les animaux utilisés l'auront été en vain). Afin de respecter cet objectif, il est nécessaire de recourir à la biostatistique pour déterminer le nombre d'animaux optimal pour pouvoir extraire des données de qualité. Dans cette optique de réduction, reproduire des expériences d'études précédentes pour lesquelles on a déjà obtenu des résultats qualitatifs est inutile.

→ **Remplacer** : c'est le second objectif. Celui-ci encourage fortement l'utilisation de méthodes alternatives, comme nous avons pu le voir plus haut. S'il y a possibilité d'utiliser une méthode alternative à l'utilisation d'animaux vivant, compatible avec l'objectif de l'étude, alors cette opportunité doit être saisie.

→ **Raffiner** : ce principe vise à réduire la douleur et la détresse des animaux utilisés en raffinant les procédures expérimentales. Cela consiste à améliorer le bien-être des animaux lors des protocoles (penser les expériences pour limiter le stress et la douleur), lors du transport, lors de l'hébergement, etc. Dans la mesure du possible, il faut privilégier les procédures non invasives et prévoir une anesthésie ou une analgésie.

2. Réflexion personnelle

La société vit actuellement une période paradoxale où on observe à la fois un développement fulgurant de nos connaissances (et un développement de l'accessibilité à ce savoir) et un scepticisme vis-à-vis de la science, voire de la communauté scientifique. Elle exige – à juste titre – des chercheurs le développement d'un médicament qui soit totalement sûr, sans dommage pour l'homme, mais aussi 100% efficace. Néanmoins, une partie de la société représentée par de grandes associations de protection animale(143,144) estime que certaines méthodes ne devraient plus être utilisées pour y parvenir : l'expérimentation animale en est un exemple.

En tant que professionnels de santé, il ne nous est pas permis d'exclure l'éthique de notre pratique. Cette réflexion doit donc également concerner les animaux utilisés en recherche.

A la place d'une conclusion récapitulant les principaux aspects de cette thèse, j'ai préféré terminer par une discussion éthique. Cette partie n'engage que ma propre personne, et je me permets simplement d'aborder des pistes de réflexion. Il existe une multitude d'opinions diverses à ce sujet, rendant le débat d'autant plus intéressant à mon sens. Malgré tout le travail apporté dans cette thèse, il y a encore un grand nombre de choses que je ne sais pas au sujet de l'expérimentation animale. Sur la base de ce que j'ai appris jusqu'à maintenant, je vais essayer d'apporter mon point de vue sur l'éthique de l'expérimentation animale en axant ma réflexion autour de trois questions :

3. Est-il moral de placer l'intérêt humain au-dessus de celui des autres espèces ?
4. L'expérimentation animale contribue-t-elle réellement à la médecine d'aujourd'hui ?
5. Est-il possible de la remplacer au vu des connaissances actuelles ?

Parlons dans un premier temps de la raison d'être de l'expérimentation animale. Si nous l'avons développée, c'était d'abord pour assouvir notre curiosité du

fonctionnement biologique et anatomique. Aujourd'hui, l'utilisation d'animaux dans la recherche a pour but premier d'améliorer la santé humaine (et animale). Nous sacrifions consciemment des animaux pour accroître nos connaissances relatives à la santé, connaissances qui permettront de sauver des vies humaines. Le choix a été fait d'utiliser des animaux plutôt que des hommes lors d'expérimentation, et ce choix relève plus de la moralité que de la science : puisque le but est de sauver des vies humaines, nous ne pouvons éthiquement pas en sacrifier pour atteindre ce but.

Nous avons ainsi choisi, en tant que société, de placer l'intérêt de l'espèce humaine au-dessus de l'intérêt des autres espèces animales. La moralité de cette décision est remise en question par un certain courant : l'antispécisme – développé par les philosophes Richard D. Ryder et Peter Singer dans les années 1970. Ce dernier consiste à placer tous les individus sur un même pied d'égalité quelle que soit l'espèce à laquelle ils appartiennent, et refuse toute notion de hiérarchie au sein du règne animal. L'antispécisme considère donc les animaux comme des êtres tout aussi sensibles et moraux que l'homme (qui n'est en rien supérieur ou inférieur aux autres animaux) et rejette toute discrimination basée sur l'espèce. Ma question est donc la suivante : est-il moral de faire passer les intérêts de sa propre espèce en priorité ? Je crois que chaque espèce animale (et même végétale) privilégie son propre intérêt (soit en tant qu'individu, soit en tant qu'espèce) avant celui de ses congénères ou des autres espèces. Ce n'est pas véritablement un choix conscient, et cela relève probablement plus de l'instinct de survie. Mais c'est bien ce que les animaux (nous y compris) font au quotidien. Lorsqu'un renard chasse et mange un mulot, il fait bien passer sa survie avant celle du mulot, lorsqu'une mère protège ses petits d'éventuels prédateurs, elle fait passer la survie de sa descendance (et donc de son espèce) avant le reste. Il me semble donc normal et moral de privilégier sa propre survie. J'ajouterai cependant, que la survie d'une espèce est généralement très intriquée avec la survie des autres espèces dans le même écosystème. Si je reprends mon exemple plus haut, si le renard chasse tous les mulots et que ces derniers venaient à disparaître, c'est sa propre survie qui en serait également impactée. Privilégier sa propre espèce ne signifie donc pas éradiquer toutes les autres. Si nous avons besoin de manger, il me paraît moral de tuer des animaux pour satisfaire ce besoin primaire. Mais pour autant, il ne me paraît pas moral de tuer des animaux pour consommer 500 grammes de

viande par jour, car cela ne relève plus du besoin mais du plaisir. Il ne me paraît pas moral non plus de faire souffrir inutilement un animal avant de l'exécuter, même si je le fais pour un besoin d'alimentation. Je sais que ce sont deux débats différents – celui de l'expérimentation animale et celui de la consommation de viande – mais je crois que ces deux notions sont liées : si l'on doit rejeter la valeur morale de l'expérimentation animale, alors on devrait également rejeter celle de la consommation de chair animale, et inversement. Pour ma part, il me semble que sacrifier des vies animales plutôt que des vies humaines est un choix moral lorsqu'il s'avère nécessaire pour notre propre survie. Mais cela devrait être un choix débattu par les citoyens : nous pourrions soit choisir, collectivement, de sacrifier des vies animales pour sauver des vies humaines, mais nous pourrions également choisir de ne pas en sacrifier même si cela limitait l'avancée de la médecine. Que ce soit l'un ou l'autre, je pense que ça doit être un choix collectif et débattu en société. Cette question de sacrifice animal en soulève une autre : si on part du principe qu'il est moral de sacrifier une vie animale plutôt qu'une vie humaine dans un but de survie, il faut alors se demander s'il est absolument nécessaire de le faire ?

Avant d'accepter l'utilisation d'animaux vivants pour la science et leur sacrifice, il faut encore être certain de la validité de cette démarche. L'expérimentation animale est-elle nécessaire pour faire avancer la recherche ? A-t-elle contribué à améliorer notre santé et notre espérance de vie jusqu'à maintenant ? La plupart des Prix Nobels sont basés sur des recherches utilisant des animaux⁽¹⁴⁵⁾ : la découverte de l'insuline en 1923 par Frederick Banting et John MacLeod, le développement de la Fécondation In Vitro par Robert G. Edwards en 2010, etc. Nous n'allons pas détailler ici toutes les découvertes scientifiques basées sur l'utilisation d'animaux car il y en a beaucoup d'autres (antirétroviraux contre le VIH, traitements anticancéreux, fonctionnement des hormones, ...). Ces avancées majeures dans le monde médical n'auraient pas été possibles sans l'utilisation d'animaux. Prenons l'exemple de Thomas Morgan qui a découvert le rôle des chromosomes dans l'hérédité. Il a utilisé des drosophiles afin de voir, au fil des générations, quels traits se transmettaient à la descendance. Pour cela, il a croisé certaines mouches avec d'autres pour identifier des caractères dits « récessifs » ou « dominants ». S'il avait dû utiliser des hommes au lieu de mouches,

ses recherches auraient pris bien plus de temps car il aurait fallu observer ces hommes et leurs descendances sur plusieurs générations, ce qui ne pose pas de soucis avec des drosophiles dont le cycle de reproduction est très rapide. Il aurait également fallu trouver des hommes avec des caractéristiques bien particulières qui soient consentants pour « se croiser » et observer les traits de leur descendance. Par ailleurs, les drosophiles ont un nombre de chromosomes faible, ce qui a « facilité » la découverte des principes de l'hérédité.

Nous pouvons donc en déduire que l'utilisation d'animaux a bel et bien permis des avancées scientifiques jusqu'à aujourd'hui. Qu'en est-il des recherches actuelles ? L'enquête statistique sur l'utilisation des animaux à des fins scientifiques au sein des établissements français montre que les animaux sont principalement utilisés pour 3 raisons : la recherche fondamentale, la recherche appliquée, puis pour des raisons réglementaires (approbation des médicaments sur le marché). La recherche fondamentale et la recherche appliquée sont à l'origine des découvertes scientifiques en apportant une multitude de nouvelles connaissances. L'utilisation d'animaux dans la recherche fondamentale est parfois controversée et jugée inutile car à elle seule, elle ne permet pas de soigner des maladies. Comme nous l'avons vu au tout début de cette thèse, la recherche fondamentale ne s'axe pas autour du développement d'un médicament ou de la guérison d'une pathologie. Du coup, certains s'interrogent sur le bien-fondé de l'utilisation d'animaux dans un domaine qui, a priori, ne mène pas directement à l'amélioration de la santé humaine. Toutefois, il serait inapproprié de dire que la recherche fondamentale ne contribue pas à l'amélioration de la santé humaine car elle précède toute recherche appliquée. Sans recherche fondamentale – sans compréhension des mécanismes biologiques du vivant, à la fois sains et pathologiques – il n'y a pas de recherche appliquée. Illustrons avec un exemple : celui de la découverte de la vitamine K. Dans les années 1920, le biochimiste Carl Henrik Dam utilise des poulets pour étudier le rôle du cholestérol, en les nourrissant avec une alimentation pauvre en lipides. Il observe que les poulets soumis à ce régime présentent des hémorragies et en déduit que son régime alimentaire doit manquer d'une substance à effet coagulant : la vitamine K. Sa découverte relève de la recherche fondamentale, il n'avait pas l'intention de découvrir cette vitamine, ni de traiter des

hémorragies. Pourtant, cette découverte a mené bien plus tard à la naissance des anti-vitamine K, utilisés aujourd'hui dans le traitement anticoagulant des patients à risque. Le problème de l'utilisation d'animaux dans la recherche fondamentale ne relève pas de son utilité ni de son efficacité, nous savons que les découvertes d'aujourd'hui, même minimes, serviront à la recherche appliquée de demain. Il s'agirait plutôt de s'interroger sur l'optimisation de l'utilisation des animaux dans la recherche : de nombreuses expérimentations ne sont pas reproductibles (peu fiables) et présentent un cruel manque de méthodologie, obligeant les chercheurs à multiplier le recours aux animaux pour répondre à une seule question(133). Des vies animales sont ainsi « gaspillées » car on ne peut pas se baser sur les résultats d'études précédentes peu fiables. Il n'existe pas non plus de registre officiel (comme c'est le cas pour les essais cliniques) permettant un partage des informations sur chaque protocole expérimental déjà réalisé auparavant. Pourtant, la mise en commun des résultats suite à une expérimentation permettrait à d'autres chercheurs de s'appuyer dessus pour leurs propres recherches. Quelles sont les raisons de ce manque de partage d'informations ? Peut-être des raisons de confidentialité ? De moyens techniques ? Je crois qu'aujourd'hui, l'utilisation d'animaux est nécessaire à la recherche, elle nous fournit des informations et des données qu'on ne peut pas collecter autrement. Elle mériterait cependant d'être optimisée afin de réduire encore le nombre d'animaux utilisés et éviter la répétition inutile d'expérimentations.

Parlons à présent de l'utilisation d'animaux dans le domaine réglementaire des médicaments : leur utilisation est-elle justifiée ? Les études précliniques réglementaires sont-elles efficaces ? Nous avons déjà abordé ce sujet dans la partie « Limites de l'expérimentation animale » : 89%(128) des candidats ayant passé avec succès les tests précliniques échoue lors des essais cliniques, principalement en raison d'une toxicité non anticipée. Cela suppose que les tests précliniques ne sont pas suffisamment prédictifs pour un certain nombre de molécules(128,130,131,146). C'est assez logique au vu des différences inter-espèces. Il faut pourtant garder à l'esprit que c'est pour cette raison que les tests de toxicité doivent inclure une espèce de rongeur et une espèce non rongeur. Et bien que les tests précliniques ne soient pas fiables à 100%, ils nous permettent d'écartier des candidats médicaments ayant un potentiel

trop toxique. Si nous supprimons ces tests précliniques, devons-nous passer directement aux essais cliniques sur l'homme ? Devrons-nous nous contenter de tests *in vitro* et *in silico* ? Ou bien devons-nous arrêter le développement de médicaments tout simplement ?

En dernier lieu, nous parlerons de la possibilité de remplacer l'expérimentation animale. Il existe de plus en plus de données sur les méthodes alternatives, et nombre d'entre elles sont déjà utilisées aujourd'hui. Cependant, dans la grande majorité des cas, elles viennent en complément de l'utilisation d'animaux, permettant ainsi de réduire leur nombre. Elles apportent des données complémentaires afin d'optimiser les protocoles expérimentaux, et comprendre le mécanisme d'action des molécules. Bien que très utiles, elles ne peuvent pas totalement remplacer le modèle animal aujourd'hui, qui est le seul à refléter le fonctionnement d'un organisme complet (avec des interactions tissulaires, inter-organes, etc.). En effet, la biologie d'un être vivant ne se résume pas à un rassemblement de cellules. Les cellules se regroupent pour former des tissus, des organes, aux fonctions bien spécifiques, et qui interagissent entre eux via des systèmes très complexes. Il n'est aujourd'hui pas possible de reproduire l'entièreté du système nerveux dans une boîte de pétri, ou bien reproduire les effets du système immunitaire sur l'ensemble des organes. Avec des méthodes alternatives, on peut connaître l'effet d'un médicament sur des cellules immunitaires spécifiques, mais on ne peut pas prédire l'effet sur l'ensemble du système immunitaire, comment ce dernier va réagir dans sa globalité, quelles conséquences cela aura sur les autres systèmes, ...

Par ailleurs, de nombreuses méthodes dites alternatives reposent sur l'utilisation de cellules animales, et ont donc nécessité la plupart du temps la mise à mort d'animaux pour obtenir ces tissus. Ces animaux, élevés et mis à mort pour la culture de cellules et tissus, ne rentrent d'ailleurs pas dans les chiffres de l'expérimentation animale (cela ne rentre pas dans la définition légale d'une expérimentation animale). En remplaçant l'utilisation d'animaux vivants par des méthodes *in vitro* sur cellules animales, nous ne faisons que déplacer le problème, bien que parfois il s'agit de tissus récupérés d'expériences précédentes ou d'abattoir pour viande.

Les méthodes alternatives ont toutefois un avenir prometteur, notamment avec le développement d'organoïdes et de modèles *in silico*. Nous pouvons espérer que les efforts de recherche dans ce domaine faciliteront la validation de futures méthodes alternatives en remplacement de l'utilisation d'animaux, pour qu'un jour nous puissions contribuer à la santé humaine sans avoir recours aux animaux.



Table Ronde HECTOR (Université de Namur) : doit-on se passer de l'expérimentation animale ?

X. Annexes

1. Dimensions des cages

2. Dimension des cages ou enclos

2.1. Souris, rats, gerbilles, hamsters et cobayes

Dans les tableaux suivants relatifs aux souris, rats, gerbilles, hamsters et cobayes, la « hauteur du compartiment » désigne la distance verticale entre le sol et la partie horizontale supérieure du compartiment ; cette hauteur est applicable pour plus de 50 % de la surface minimale au sol du compartiment, avant l'insertion des éléments d'enrichissement.

Lors de la conception des compartiments, il convient de prendre en compte la croissance potentielle des animaux de manière à garantir un espace adéquat (conformément aux indications des tableaux 1.1 à 1.5) pendant toute la durée de l'étude.

Tableau 1.1. – *Souris*

	POIDS CORPOREL (g)	DIMENSION MINIMALE du compartiment (cm ²)	SURFACE AU SOL par animal (cm ²)	HAUTEUR MINIMALE du compartiment (cm)	DATE d'application
Réserve et pendant les procédures	Jusqu'à 20 De plus de 20 à 25 De plus de 25 à 30 Plus de 30	330 330 330 330	60 70 80 100	12 12 12 12	1 ^{er} janvier 2017
Reproduction		330 Pour un couple monogame (non consanguin/ consanguin) ou un trio (consanguin). Pour chaque femelle supplémentaire avec sa portée, il faut ajouter 180 cm ²		12	
Réserve chez les éleveurs (*) Taille du compartiment: 950 cm ²	Moins de 20	950	40	12	
Taille du compartiment: 1500 cm ²	Moins de 20	1500	30	12	
(*) Les souris sevrées peuvent être hébergées avec ces densités de peuplement plus élevées pendant la courte période qui suit le sevrage jusqu'à ce qu'elles se reproduisent, à condition d'utiliser des compartiments plus grands et d'assurer un enrichissement suffisant et que ces conditions d'hébergement ne réduisent en rien le bien-être des animaux, étant par exemple à l'origine d'une plus grande agressivité, morbidité ou mortalité, de stéréotypies et d'autres troubles du comportement, perte de poids ou autres réactions physiologiques ou comportementales au stress.					

Tableau 1.2. – Rats

	POIDS CORPOREL (g)	DIMENSION MINIMALE du compartiment (cm ²)	SURFACE AU SOL par animal (cm ²)	HAUTEUR MINIMALE du compartiment (cm)	DATE d'application
Réserve et pendant les procédures (*)	Jusqu'à 200	800	200	18	1 ^{er} janvier 2017
	De plus de 200 à 300	800	250	18	
	De plus de 300 à 400	800	350	18	
	De plus de 400 à 600	800	450	18	
	Plus de 600	1 500	600	18	
Reproduction		800 Mère et portée. Pour chaque animal adulte supplémentaire introduit de façon permanente dans le compartiment, ajouter 400 cm ² .		18	
Réserve chez les éleveurs (**) Taille du compartiment : 1 500 cm ²	Jusqu'à 50	1 500	100	18	
	De plus de 50 à 100	1 500	125	18	
	De plus de 100 à 150	1 500	150	18	
	De plus de 150 à 200	1 500	175	18	
Réserve chez les éleveurs (**) Taille du compartiment : 2 500 cm ²	Jusqu'à 50	2 500	100	18	
	De plus de 50 à 100	2 500	125	18	
	De plus de 100 à 150	2 500	150	18	

(*) Pour les études de longue durée, si l'espace alloué à chaque animal devient inférieur à celui indiqué ci-dessus vers la fin des études en question, la priorité doit être donnée au maintien de structures sociales stables.

(**) Les rats sevrés peuvent être hébergés avec ces densités de peuplement plus élevées pendant la courte période qui suit le sevrage jusqu'à ce qu'ils se reproduisent, à condition d'utiliser des compartiments plus grands et d'assurer un enrichissement suffisant et que ces conditions d'hébergement ne réduisent en rien le bien-être des animaux, étant par exemple à l'origine d'une plus grande agressivité, morbidité ou mortalité, de stéréotypies et d'autres troubles du comportement, perte de poids ou autres réactions physiologiques ou comportementales au stress.

Tableau 1.3. – Gerbilles

	POIDS CORPOREL (g)	DIMENSION MINIMALE du compartiment (cm ²)	SURFACE AU SOL par animal (cm ²)	HAUTEUR MINIMALE du compartiment (cm)	DATE d'application
Réserve et pendant les procédures	Jusqu'à 40	1 200	150	18	1 ^{er} janvier 2017
	Plus de 40	1 200	250	18	
Reproduction		1 200 Couple monogame ou trio avec descendance		18	

Tableau 1.4. – Hamsters

	POIDS CORPOREL (g)	DIMENSION MINIMALE du compartiment (cm ²)	SURFACE AU SOL par animal (cm ²)	HAUTEUR MINIMALE du compartiment (cm)	DATE d'application
Réserve et pendant les procédures (*)	Jusqu'à 60	800	150	14	1 ^{er} janvier 2017
	De plus de 60 à 100	800	200	14	
	Plus de 100	800	250	14	

	POIDS CORPOREL (g)	DIMENSION MINIMALE du compartiment (cm ²)	SURFACE AU SOL par animal (cm ²)	HAUTEUR MINIMALE du compartiment (cm)	DATE d'application
Reproduction		800 Mère ou couple monogame avec portée		14	
Réserve chez les éleveurs (**)	Moins de 60	1500	100	14	

(*) Les hamsters sevrés peuvent être hébergés avec ces densités de peuplement plus élevées pendant la courte période qui suit le sevrage jusqu'à ce qu'ils se reproduisent, à condition d'utiliser des compartiments plus grands et d'assurer un enrichissement suffisant et que ces conditions d'hébergement ne réduisent en rien le bien-être des animaux, étant par exemple à l'origine d'une plus grande agressivité, morbidité ou mortalité, de stéréotypies et d'autres troubles du comportement, perte de poids ou autres réactions physiologiques ou comportementales au stress.

Tableau 1.5. – Cobayes

	POIDS CORPOREL (g)	DIMENSION MINIMALE du compartiment (cm ²)	SURFACE AU SOL par animal (cm ²)	HAUTEUR MINIMALE du compartiment (cm)	DATE d'application
Réserve et pendant les procédures (*)	Jusqu'à 200 De plus de 200 à 300 De plus de 300 à 450 De plus de 450 à 700 Plus de 700	1800 1800 1800 2500 2500	200 350 500 700 900	23 23 23 23 23	1 ^{er} janvier 2017
Reproduction		2500 Couple avec portée. Pour chaque femelle reproductrice supplémentaire, ajouter 1000 cm ²		23	

2.2. Lapins

Dans le cadre de la recherche agricole, lorsque l'objectif du projet exige que les animaux soient hébergés dans des conditions similaires à celles des animaux de ferme élevés dans un but commercial, l'hébergement doit au moins satisfaire aux normes fixées dans la directive 98/58/CE (1).

Une plate-forme doit être prévue à l'intérieur du compartiment. Cette plate-forme doit permettre à l'animal de s'y étendre ou de s'y asseoir et de se déplacer facilement en dessous ; elle ne doit pas couvrir plus de 40 % de l'espace au sol. S'il existe des raisons scientifiques ou vétérinaires de ne pas utiliser une plate-forme, la taille du compartiment doit être supérieure de 33 % pour un lapin seul et de 60 % pour deux lapins. Lorsqu'une plate-forme est mise à la disposition de lapins de moins de dix semaines, la taille de la plate-forme doit être d'au moins 55 cm sur 25 cm et la hauteur doit permettre aux animaux de l'utiliser.

(1) Directive 98/58/CE du Conseil du 20 juillet 1998 concernant la protection des animaux dans les élevages (JOUE n° L 221 du 8 août 1998, p. 23).

Tableau 2.1. – Lapins de plus de dix semaines

Le tableau 2.1 concerne les cages et les enclos. La surface au sol supplémentaire est de 3 000 cm² par lapin, pour le troisième, le quatrième, le cinquième et le sixième, et de 2 500 cm² au minimum pour chaque lapin supplémentaire au-delà de six.

POIDS CORPOREL FINAL (kg)	SURFACE AU SOL MINIMALE pour un ou deux animaux socialement harmonieux (cm ²)	HAUTEUR MINIMALE (cm)	DATE D'APPLICATION
Moins de 3	3 500	45	1 ^{er} janvier 2017

POIDS CORPOREL FINAL (kg)	SURFACE AU SOL MINIMALE pour un ou deux animaux socialement harmonieux (cm ²)	HAUTEUR MINIMALE (cm)	DATE D'APPLICATION
De plus de 3 à 5	4 200	45	
Plus de 5	5 400	60	

Tableau 2.2. – *Lapine avec portée*

POIDS DE LA LAPINE (kg)	DIMENSION MINIMALE du compartiment (cm ²)	SUPPLÉMENT pour les boîtes à nid (cm ²)	HAUTEUR MINIMALE (cm)	DATE d'application
Moins de 3	3 500	1 000	45	1 ^{er} janvier 2017
De plus de 3 à 5	4 200	1 200	45	
Plus de 5	5 400	1 400	60	

Tableau 2.3. – *Lapins de moins de dix semaines*

Le tableau 2.3 concerne les cages et les enclos.

AGE	DIMENSION MINIMALE du compartiment (cm ²)	SUPPLÉMENT pour les boîtes à nid (cm ²)	HAUTEUR MINIMALE (cm)	DATE d'application
Du sevrage à 7 semaines	4 000	800	40	1 ^{er} janvier 2017
De 7 à 10 semaines	4 000	1 200	40	

Tableau 2.4. – *Lapins : dimensions optimales des plates-formes pour des compartiments correspondant aux dimensions indiquées dans le tableau 2.1*

AGE EN SEMAINES	DIMENSION MINIMALE du compartiment (cm ²)	SUPPLÉMENT pour les boîtes à nid (cm ²)	HAUTEUR MINIMALE (cm)	DATE d'application
Plus de 10	Moins de 3	55 x 25	25	1 ^{er} janvier 2017
	De plus de 3 à 5	55 x 30	25	
	Plus de 5	60 x 35	30	

2.3. Chats

Les chats ne peuvent être hébergés individuellement pendant plus de vingt-quatre heures d'affilée. Les chats qui se montrent souvent agressifs envers d'autres chats ne doivent être isolés que s'il n'est pas possible de leur trouver un compagnon compatible. Le stress lié aux interactions sociales doit être contrôlé au moins chaque semaine chez tous les individus hébergés par paire ou en groupe. Les femelles avec des chatons de moins de quatre semaines ou dans les deux dernières semaines de gestation peuvent être hébergées individuellement.

Tableau 3. – *Chats*

La superficie minimale dont une chatte et sa portée doivent disposer est la même que celle pour un chat seul et doit être augmentée graduellement de telle façon que, à l'âge de quatre mois, les chatons soient relogés conformément aux exigences d'espace prévues pour les adultes.

Les aires d'alimentation et celles prévues pour les bacs à litière ne doivent pas être distantes de moins de 50 cm et ne doivent jamais être mises à la place l'une de l'autre.

	SOL (*) (m ²)	PLATES-FORMES (m ²)	HAUTEUR (m)	DATE d'application
Minimum pour un animal adulte	1,5	0,5	2	1 ^{er} janvier 2017
Pour chaque animal supplémentaire	0,75	0,25	-	
(*) Surface au sol à l'exclusion des plates-formes.				

2.4. Chiens

Les chiens doivent pouvoir, dans la mesure du possible, se dépenser à l'extérieur. Les chiens ne doivent pas être hébergés individuellement pendant plus de quatre heures d'affilée.

Le compartiment intérieur doit représenter au moins 50 % de l'espace minimal disponible pour les chiens, tel que précisé dans le tableau 4.1.

Les dimensions données ci-dessous sont fondées sur les valeurs requises pour les beagles, mais les races géantes, telles que le saint-bernard ou le wolfhound irlandais, doivent disposer d'un espace bien plus important que celui indiqué dans le tableau 4.1. Pour les races autres que le beagle, l'espace nécessaire doit être déterminé en consultation avec le personnel vétérinaire.

Tableau 4.1. – Chiens

Un chien logé avec un autre chien ou en groupe peut être confiné dans la moitié de l'espace total prévu (2 m² pour un chien de moins de 20 kg, 4 m² pour un chien de plus de 20 kg) pendant qu'il est soumis à des procédures au sens de la présente directive, si cet isolement est indispensable pour des motifs scientifiques. La période de confinement ne peut dépasser quatre heures d'affilée.

Une chienne allaitante et sa portée doivent disposer du même espace qu'une chienne seule de poids équivalent. Le compartiment de parturition doit être conçu de manière que la chienne puisse se déplacer dans un compartiment supplémentaire ou sur une plate-forme, à l'écart des chiots.

POIDS (kg)	DIMENSION MINIMALE du compartiment (m ²)	SURFACE AU SOL pour un ou deux animaux (m ²)	POUR CHAQUE ANIMAL supplémentaire ajouter un minimum de (m ²)	HAUTEUR MINIMALE (m)	DATE d'application
Jusqu'à 20	4	4	2	2	1 ^{er} janvier 2017
Plus de 20	8	8	4	2	

Tableau 4.2. – Chiens : après le sevrage

POIDS DU CHIEN (kg)	DIMENSION MINIMALE du compartiment (m ²)	SURFACE AU SOL par animal (m ²)	HAUTEUR MINIMALE (m)	DATE D'APPLICATION
Jusqu'à 5	4	0,5	2	1 ^{er} janvier 2017
De plus de 5 à 10	4	1,0	2	
De plus de 10 à 15	4	1,5	2	
De plus de 15 à 20	4	2	2	
Plus de 20	8	4	2	

2.5. Furets

Tableau 5. – Furets

	DIMENSION MINIMALE du compartiment (m ²)	SURFACE AU SOL par animal (m ²)	HAUTEUR MINIMALE (m)	DATE D'APPLICATION
Animaux jusqu'à 600 g	4 500	1 500	50	1 ^{er} janvier 2017
Animaux de plus de 600 g	4 500	3 000	50	
Mâles adultes	6 000	6 000	50	
Femelles et jeunes	5 400	5 400	50	

2.6. Primates

Les jeunes primates ne doivent pas être séparés de leur mère avant l'âge de six à douze mois selon l'espèce. L'environnement doit permettre aux primates de se livrer quotidiennement à des activités complexes. Le compartiment doit leur permettre d'adopter des comportements aussi variés que possible, leur donner un sentiment de sécurité et leur offrir un environnement assez complexe pour leur permettre de courir, marcher, grimper et sauter.

Tableau 6.1. – *Ouistitis et tamarins*

	SURFACE MINIMALE du compartiment au sol pour un (*) ou deux animaux plus les petits jusqu'à l'âge de 5 mois (m ²)	VOLUME MINIMAL par animal supplémentaire au-dessus de 5 mois (m ³)	HAUTEUR MINIMALE du compartiment (m) (**)	DATE d'application
Ouistitis	0,5	0,2	1,5	1 ^{er} janvier 2017
Tamarins	1,5	0,2	1,5	

(*) Les animaux ne doivent être hébergés individuellement que dans des circonstances exceptionnelles.
(**) Le haut du compartiment doit être au moins à 1,80 m du sol.

Les jeunes ouistitis et tamarins ne doivent pas être séparés de leur mère avant l'âge de huit mois.

Tableau 6.2. – *Saimiris*

SURFACE AU SOL MINIMALE pour un (*) ou deux animaux (m ²)	VOLUME MINIMAL par animal supplémentaire de plus de 5 mois (m ³)	HAUTEUR MINIMALE du compartiment (m)	DATE d'application
2,0	0,5	1,8	1 ^{er} janvier 2017

(*) Les animaux ne doivent être hébergés individuellement que dans des circonstances exceptionnelles.

Les jeunes saïmiris ne doivent pas être séparés de leur mère avant l'âge de six mois.

Tableau 6.3. – *Macaques et vervets* (*)

	DIMENSION MINIMALE du compartiment (m ²)	VOLUME MINIMAL du compartiment (m ³)	VOLUME MINIMAL par animal (m ³)	HAUTEUR MINIMALE du compartiment (m)	DATE d'application
Animaux de moins de 3 ans (**)	2,0	3,6	1,8	1,8	1 ^{er} janvier 2017

	DIMENSION MINIMALE du compartiment (m ²)	VOLUME MINIMAL du compartiment (m ³)	VOLUME MINIMAL par animal (m ³)	HAUTEUR MINIMALE du compartiment (m)	DATE d'application
Animaux de 3 ans ou plus (***)	2,0	3,6	1,8	1,8	
Animaux détenus pour la reproduction (****)			3,5	2,0	

(*) Les animaux ne doivent être hébergés individuellement que dans des circonstances exceptionnelles.
(**) Un compartiment de dimensions minimales peut héberger jusqu'à trois animaux.
(***) Un compartiment de dimensions minimales peut héberger jusqu'à deux animaux.
(****) Dans une colonie reproductrice, aucun espace/volume supplémentaire n'est requis pour de jeunes animaux jusqu'à l'âge de deux ans hébergés avec leur mère.

Les jeunes macaques et vervets ne doivent pas être séparés de leur mère avant l'âge de huit mois.

Tableau 6.4. – Babouins (*)

	DIMENSION MINIMALE du compartiment (m ²)	VOLUME MINIMAL du compartiment (m ³)	VOLUME MINIMAL par animal (m ³)	HAUTEUR MINIMALE du compartiment (m)	DATE d'application
Animaux de moins de 4 ans (**)	4,0	7,2	3,0	1,8	1 ^{er} janvier 2017
Animaux de 4 ans ou plus (**)	7,0	12,6	6,0	1,8	
Animaux détenus pour la reproduction (***)			12,0	2,0	

(*) Les animaux de doivent être hébergés individuellement que dans des circonstances exceptionnelles.
(**) Un compartiment de dimensions minimales peut héberger jusqu'à trois animaux.
(***) Dans une colonie reproductrice, aucun espace/volume supplémentaire n'est requis pour de jeunes animaux jusqu'à l'âge de deux ans hébergés avec leur mère.

Les jeunes babouins ne doivent pas être séparés de leur mère avant l'âge de huit mois.

2.7. Animaux de ferme

Dans le cadre de la recherche agricole, lorsque l'objectif du projet exige que les animaux soient hébergés dans des conditions similaires à celles des animaux de ferme élevés dans un but commercial, l'hébergement doit satisfaire au moins aux normes fixées dans les directives 98/58/CE, 91/629/CEE (2) et 91/630/CEE (3).

(2) Directive 91/629/CE du Conseil du 19 novembre 1991 établissant les normes minimales relatives à la protection des veaux (JOUE L 340 du 11 décembre 1991, p. 28).

(3) Directive 91/630/CE du Conseil du 19 novembre 1991 établissant les normes minimales relatives à la protection des porcs (JOUE L 340 du 11 décembre 1991, p. 33).

Tableau 7.1. – Bovins

POIDS CORPOREL (kg)	DIMENSION MINIMALE du compartiment (m ²)	SURFACE AU SOL minimale par animal (m ² /animal)	ESPACE à la mangeoire pour l'alimentation à volonté de bovins décornés (m/animal)	ESPACE à la mangeoire pour l'alimentation restreinte de bovins décornés (m/animal)	DATE d'application
Jusqu'à 100	2,50	2,30	0,10	0,30	1 ^{er} janvier 2017

POIDS CORPOREL (kg)	DIMENSION MINIMALE du compartiment (m ²)	SURFACE AU SOL minimale par animal (m ² /animal)	ESPACE à la mangeoire pour l'alimentation à volonté de bovins décornés (m/animal)	ESPACE à la mangeoire pour l'alimentation restreinte de bovins décornés (m/animal)	DATE d'application
De plus de 100 à 200	4,25	3,40	0,15	0,50	
De plus de 200 à 400	6,00	4,80	0,18	0,60	
De plus de 400 à 600	9,00	7,50	0,21	0,70	
De plus de 600 à 800	11,00	8,75	0,24	0,80	
Plus de 800	16,00	10,00	0,30	1,00	

Tableau 7.2. – Moutons et chèvres

POIDS CORPOREL (kg)	DIMENSION minimale du compartiment (m ²)	SURFACE au sol minimale par animal (m ² /animal)	HAUTEUR minimale des séparations (m)	ESPACE à la mangeoire pour l'alimentation à volonté de bovins décornés (m/animal)	ESPACE à la mangeoire pour l'alimentation restreinte de bovins décornés (m/animal)	DATE d'application
Moins de 20	1,0	0,7	1,0	0,10	0,25	1 ^{er} janvier 2017
De plus de 20 à 35	1,5	1,0	1,2	0,10	0,30	
De plus de 35 à 60	2,0	1,5	1,2	0,12	0,40	
Plus de 60	3,0	1,8	1,5	0,12	0,50	

Tableau 7.3. – Porcs et mini-porcs

POIDS VIF (kg)	DIMENSION MINIMALE du compartiment (*) (m ²)	SURFACE AU SOL minimale par animal (m ² /animal)	ESPACE MINIMAL de l'aire de repos par animal (en conditions thermiques neutres) (m ² /animal)	DATE D'APPLICATION
Jusqu'à 5	2,0	0,20	0,10	1 ^{er} janvier 2017
De plus de 5 à 10	2,0	0,25	0,11	
De plus de 10 à 20	2,0	0,35	0,18	
De plus de 20 à 30	2,0	0,50	0,24	
De plus de 30 à 50	2,0	0,70	0,33	
De plus de 50 à 70	3,0	0,80	0,41	
De plus de 70 à 100	3,0	1,00	0,53	
De plus de 100 à 150	4,0	1,35	0,70	
Plus de 150	5,0	2,50	0,95	

2. Encadrement légal de l'expérimentation animale

a. *Législation française et législation européenne*

La directive européenne 2010/63 a été transposée dans le droit français par différents décrets publiés en 2013. Depuis cette date, la réglementation française est identique à la réglementation européenne en vigueur. Elle est sous la responsabilité du ministère de l'Agriculture et regroupe les articles de loi allant de R214-87 à R214-137 du code rural.

Nous allons détailler ci-dessous les principaux articles de loi concernant la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (nous avons déjà pu voir certains extraits de lois dans la partie « hébergement des animaux » plus haut).

b. *Champs d'application et définitions (R214-87 à 89)*

Article R214-87

Toute la législation concernée s'applique « lorsque des animaux sont utilisés ou destinés à être utilisés dans des procédures expérimentales [...], ou lorsqu'ils sont élevés pour que leurs organes ou tissus puissent être utilisés à des fins scientifiques ». En d'autres termes, la législation couvre les animaux utilisés dans les laboratoires, qu'ils soient utilisés en tant que tels pour des procédures ou bien élevés pour récolter des tissus et organes, qui seront par la suite utilisés à des fins expérimentales.

Elle s'applique « jusqu'à ce que les animaux [...] aient été mis à mort, placés dans un système d'élevage approprié ou relâchés dans un habitat approprié ». On comprend ici que la finalité d'un animal utilisé dans une procédure expérimentale peut être différente d'une mise à mort et que l'animal peut être réhabilité, comme nous le verrons plus tard. Une fois l'animal mort ou bien relâché, il n'est plus un animal utilisé à des fins scientifiques, donc cette législation-ci ne s'applique plus.

La législation ne s'applique pas pour toutes les espèces animales utilisées à des fins scientifiques. En effet, la législation couvre uniquement :

- « Les animaux vertébrés vivants, y compris les formes larvaires autonomes et les formes fœtales de mammifères à partir du dernier tiers de leur développement normal ;

- « Les formes larvaires autonomes et formes fœtales de mammifères à un stade de développement antérieur au dernier tiers de leur développement normal, si l'animal doit être laissé en vie au-delà de ce stade de développement et risque, à la suite des procédures expérimentales menées, d'éprouver de la douleur, de la souffrance ou de l'angoisse ou de subir des dommages durables après avoir atteint ce stade de développement ;
- « Les céphalopodes vivants. »

Les animaux tels que les mammifères, les poissons ou les oiseaux sont protégés par ces textes de loi, mais que les invertébrés (autre que les céphalopodes) ne sont pas concernés par la législation présentée ici : c'est le cas des insectes (et notamment les drosophiles), vers, etc.

Article R214-88

« N'entre pas dans le champ d'application de la présente section l'utilisation d'animaux dans les conditions suivantes :

- Les actes pratiqués dans les exploitations agricoles à des fins non expérimentales ;
- Les actes pratiqués à des fins d'élevage reconnues ;
- Les actes pratiqués dans le but premier d'identifier un animal ;
- La pratique de la médecine vétérinaire à des fins non expérimentales ;
- Les essais cliniques vétérinaires nécessaires aux fins d'une autorisation de mise sur le marché d'un médicament vétérinaire ;
- Les pratiques qui sont susceptibles de causer une douleur, une souffrance, une angoisse ou des dommages durables inférieurs à ceux causés par l'introduction d'une aiguille effectuée conformément aux bonnes pratiques vétérinaires. »

Article R214-89

Dans l'ensemble de ces textes, une procédure expérimentale est définie comme :

- « Toute utilisation, invasive ou non, d'un animal à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, y compris lorsque les résultats sont connus, ou à des fins éducatives ;

- « Toute intervention destinée ou de nature à aboutir à la naissance ou à l'éclosion d'un animal ou à la création et à la conservation d'une lignée d'animaux génétiquement modifiés.

Dès lors que cette utilisation ou cette intervention sont susceptibles de causer à cet animal une douleur, une souffrance, une angoisse ou des dommages durables équivalents ou supérieurs à ceux causés par l'introduction d'une aiguille effectuée conformément aux bonnes pratiques vétérinaires. »

Si la procédure n'engendre aucune douleur ou angoisse, elle n'entre pas dans le champ d'application de la loi. De même, les animaux reproducteurs, destinés à entretenir des lignées déjà existantes (dans le cadre d'un élevage de souris par exemple), ne sont pas couverts par la présente section. De plus, « la mise à mort d'animaux, à la seule fin d'utiliser leurs organes ou tissus, selon une méthode définie par arrêté conjoint du ministre chargé de l'agriculture et du ministre chargé de la recherche, n'est pas considérée comme une procédure expérimentale ». Cela ne veut pas dire que ces animaux ne sont pas protégés, mais leur utilisation en dehors de ces termes ne relève pas d'une « procédure expérimentale » au sens juridique.

Plusieurs définitions des termes utilisés dans la loi sont données :

« Projet : tout programme de travail répondant à un objectif scientifique défini, utilisant un ou plusieurs modèles animaux, et impliquant une ou plusieurs procédures expérimentales ;

Établissement : toute installation, tout bâtiment, tout groupe de bâtiments ou tout autre local, y compris, le cas échéant, un endroit non totalement clos ou couvert, ainsi que des installations mobiles ;

Éleveur : toute personne élevant des animaux des espèces définies par arrêté [...], en vue de leur utilisation exclusive dans des procédures expérimentales ou en vue de l'utilisation de leurs tissus ou organes à des fins scientifiques, ou élevant d'autres animaux principalement à ces fins, dans un but lucratif ou non ;

Fournisseur : toute personne autre qu'un éleveur fournissant des animaux en vue de leur utilisation dans des procédures expérimentales ou en vue de l'utilisation de leurs tissus ou organes à des fins scientifiques, dans un but lucratif ou non ;

Utilisateur : toute personne utilisant des animaux dans des procédures expérimentales ou procédant à la mise à mort d'animaux [...] ;

Affection invalidante : chez l'homme, toute diminution des capacités physiques ou psychologiques d'une personne ;

Colonie entretenue sans apport d'effectifs extérieurs : colonie dont les animaux sont élevés uniquement au sein de la colonie ou proviennent d'autres colonies mais n'ont pas été prélevés dans la nature et sont détenus de manière à être habitués à l'être humain. »

c. *Protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (R214-90 à 98)*

i. *Espèces animales concernées et origine des animaux*

Article R214-90

Les animaux utilisés ou destinés à être utilisés dans des procédures expérimentales doivent avoir une provenance contrôlée. C'est-à-dire qu'ils doivent provenir d'éleveurs ou fournisseurs agréés selon les modalités des articles R214-99 à 103. Les animaux peuvent provenir de l'Union Européenne, mais également en dehors de l'Union Européenne tant que les éleveurs ou fournisseurs respectent les conditions fixées par les articles R214-99 à 103.

Article R214-91

« Les animaux d'espèces domestiques errants ou vivant à l'état sauvage ne sont pas utilisés dans des procédures expérimentales ». Il n'est donc pas possible de prélever des chiens ou chats errants pour les utiliser. Une dérogation exceptionnelle peut toutefois être accordée par le ministre de l'agriculture et de la recherche, après avis favorable de la commission nationale pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, uniquement si cela s'avère nécessaire pour la santé des animaux de la même espèce ou pour la santé humaine ou pour l'environnement ; et s'il est scientifiquement démontré qu'il n'existe aucune autre alternative.

Article R214-92

Les animaux non domestiques et non tenus en captivité ne peuvent pas être utilisés lors des procédures expérimentales, sauf dérogation exceptionnelle si cela est scientifiquement justifié, qu'aucune autre alternative n'existe, et accordé par les autorités compétentes. Les animaux ainsi capturés doivent l'avoir été par des personnes compétentes et par des méthodes ne causant pas de douleur ni d'angoisse, ni de dommages durables qui pourraient être évités. Si l'animal est blessé lors de sa capture, il doit être soigné par un vétérinaire et sa souffrance doit être minimisée autant que possible.

Article R214-93

Les animaux relevant d'espèces menacées, autres que les primates, ne peuvent être utilisés dans des procédures expérimentales que s'il s'agit d'une procédure expérimentale licite (répondant à un but scientifique et à la réglementation en vigueur), et s'il est scientifiquement démontré qu'il n'est pas possible d'utiliser d'autres espèces.

Article R214-94

L'utilisation des primates lors des procédures expérimentales est soumise à une réglementation spécifique et distincte des autres animaux. Elle ne peut avoir lieu seulement si :

- La procédure expérimentale poursuit un but scientifique dans le cadre de la recherche fondamentale, ou de la recherche appliquée (dans le cadre de la prévention, la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement de maladies, de mauvais états de santé ou d'autres anomalies ou de leurs effets chez l'homme, les animaux ou les plantes), ou lors des essais réglementaires des médicaments à usage humain ou vétérinaire, ou encore en vue de la préservation des espèces. En effet, contrairement aux autres animaux, l'utilisation de primates n'est pas autorisée lorsque cela a pour but « le bien-être des animaux et l'amélioration des conditions de production des animaux élevés à des fins agronomiques », « l'évaluation, la détection, le contrôle ou les modifications des conditions physiologiques chez l'homme, les animaux ou les plantes », ou

dans le cadre de l'enseignement supérieur ou de la formation professionnelle. Quant aux espèces de primates qui font partie des espèces menacées, elles ne peuvent pas être utilisées en recherche fondamentale.

- Et s'il est scientifiquement démontré qu'il n'est pas possible d'utiliser d'autres espèces.

Enfin, il n'est pas autorisé l'utilisation de singes appartenant aux genres *Gorilla* (gorilles), *Pan* (chimpanzés) et *Pongo* (Orang-outan), sauf dérogation exceptionnelle (en cas d'urgence sanitaire).

ii. Conditions d'hébergement et d'entretien des animaux

Article R214-95

Les établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs (ainsi que leur personnel) doivent veiller aux bonnes conditions d'hébergement de leurs animaux, notamment à ce que :

- « Tous les animaux bénéficient d'un logement, d'un environnement, d'une alimentation, d'un apport en eau et de soins appropriés à leur santé et à leur bien-être ;
- Toute restriction de la capacité d'un animal de satisfaire ses besoins physiologiques et éthologiques soit limitée au strict minimum ;
- Les conditions d'environnement et les paramètres d'ambiance dans lesquels les animaux sont élevés, détenus ou utilisés fassent l'objet de vérifications quotidiennes ;
- Des mesures soient prises pour mettre fin dans les délais les plus brefs à toute anomalie ou à toute douleur, toute souffrance, toute angoisse ou tout dommage durable constatés qui pourraient être évités ;
- Les animaux soient transportés dans des conditions appropriées à leur santé et à leur bien-être. »

Article R214-96

« Les chiens, les chats et les primates qui se trouvent dans les établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs sont identifiés par un marquage individuel et

permanent. [...] Les établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs sont tenus de conserver les informations individuelles relatives à chaque chien, chat ou primate, [...] pendant au moins trois ans après la mort ou le placement de l'animal et de les mettre à la disposition des agents habilités. En cas de placement, [...] les informations utiles sur les antécédents médicaux, sanitaires et comportementaux figurant dans le dossier individuel mentionné ci-dessus accompagnent l'animal. »

Article R214-97

Les établissements sont tenus de conserver des registres des animaux consignant les divers éléments de suivi, pendant 5 ans.

iii. Conditions de mise à mort

Article R214-98

Comme vu dans la partie « Hébergement », l'euthanasie des animaux de laboratoire doit être effectuée « en limitant le plus possible la douleur, la souffrance et l'angoisse de l'animal, par une personne compétente », et par des méthodes définies par arrêté ministériel (annexe IV de la directive 2010/63/UE).

d. *Agrément et contrôle des établissements éleveurs, fournisseurs et utilisateurs (R214-99 à 104)*

i. Modalités d'agrément

Article R214-99

« Tout établissement éleveur, fournisseur ou utilisateur doit être agréé. » La demande d'agrément doit être effectuée par le responsable de l'établissement auprès du préfet du département. Toute procédure expérimentale doit avoir lieu dans un établissement agréé.

Article R214-100

« L'agrément est accordé en fonction de la vocation de l'établissement, de la nature de ses installations, des espèces animales hébergées, du type de procédures

expérimentales mises en œuvre et de la qualification de son personnel. Le préfet peut restreindre l'étendue de l'agrément demandé ou l'assortir de toute condition jugée utile. » L'agrément est alors accordé pour une durée de 6 ans, mais toute modification ou changement significatif dans l'établissement doit être notifiée au préfet.

ii. Exigences relatives au personnel des établissements

Article R214-101

« Tout établissement éleveur, fournisseur ou utilisateur doit disposer sur place d'un personnel dont la composition, la formation et le rôle sont définis par arrêté conjoint des ministres chargés de l'agriculture et de la recherche et du ministre de la défense. » La qualité du personnel relève de la responsabilité de l'établissement qui doit assurer que son personnel est compétent selon les définitions données par les autorités.

Article R214-102

L'établissement doit avoir un vétérinaire référent pour les espèces animales concernées, voire un vétérinaire spécialiste lorsque l'établissement héberge des espèces animales particulières (notamment des primates, etc.). Il aura pour responsabilité de conseiller les équipes sur le soin apporté aux animaux et sur leur bien-être.

Article R214-103

Les établissements doivent disposer d'une structure chargée du bien-être des animaux qu'ils hébergent. Si l'établissement est de très petite taille, le préfet peut accorder la délégation de cette tâche par d'autres moyens.

iii. Inspection des établissements

Article R214-104

L'inspection des établissements éleveurs, fournisseurs et utilisateurs est faite de façon régulière et réglementée. Ce sont les inspecteurs de santé publique vétérinaire, les ingénieurs ayant la qualité d'agent du ministère chargé de l'agriculture, et les

techniciens des services du ministère chargé de l'agriculture, qui ont la charge d'inspecter ces établissements afin de vérifier qu'ils sont conformes à la réglementation en vigueur.

Pour cela, les inspecteurs ont accès à tous les locaux où se trouvent les animaux pendant des horaires définies (accès au public ou pendant qu'une activité est en cours). Ils ont la possibilité de faire ouvrir des véhicules à usage professionnel dans lesquels sont transportés des animaux. Ils doivent avoir accès à tous les documents susceptibles de les aider à remplir leur mission.

Si la situation l'exige, ils peuvent ordonner la saisie ou le retrait des animaux et les confier à un tiers (notamment une association de protection animale) pour une durée maximale de trois mois.

e. Procédures expérimentales (R214-105 à 115)

i. Licéité, choix et mise en œuvre des procédures expérimentales

Article R214-105

Pour qu'une procédure expérimentale soit légale, elle doit remplir deux conditions :

- Avoir un ou plusieurs des objectifs suivants :
 - o La recherche fondamentale
 - o La recherche appliquée ou translationnelle menée pour :
 - La prévention, la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement des maladies, de mauvais états de santé ou d'autres anomalies ou de leurs effets chez l'homme, les animaux, ou les plantes
 - L'évaluation, la détection, le contrôle ou les modifications des conditions physiologiques chez l'homme, les animaux ou les plantes
 - Le bien-être des animaux et l'amélioration des conditions de production des animaux élevés à des fins agronomiques
 - o La mise au point, la production, ou les essais de qualité, d'efficacité et d'innocuité de médicaments à usage humain ou vétérinaire, de denrées

alimentaires, d'aliments pour animaux et d'autres substances ou produits

- La protection de l'environnement naturel dans l'intérêt de la santé ou du bien-être de l'homme ou de l'animal
 - La recherche en vue de la préservation des espèces
 - L'enseignement supérieur ou la formation professionnelle ou technique conduisant à des métiers qui comportent la réalisation de procédures expérimentales sur des animaux ou les soins et l'entretien de ces animaux ainsi que la formation professionnelle continue dans ce domaine
 - Les enquêtes médico-légales.
- Respecter les principes de remplacement, de réduction et de raffinement suivants :
- Les procédures expérimentales ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres stratégies ou méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information
 - Le nombre d'animaux utilisés dans un projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. A cet effet, le partage d'organes ou de tissus d'animaux mis à mort est permis entre établissements
 - Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

Article R214-106

Les utilisateurs devront choisir les méthodes les plus pertinentes pour obtenir des résultats satisfaisants tout en utilisant le moins d'animaux possible, et en causant le moins possible de douleur et de souffrance.

Article R214-107

La mort des animaux ne doit être utilisée en tant que point limite de la procédure expérimentale que si cela s'avère nécessaire.

Article R214-108

« Une procédure expérimentale n'est pas mise en œuvre si elle implique une douleur, une souffrance ou une angoisse intenses susceptibles de se prolonger sans qu'il soit possible de les soulager. »

Il existe toutefois des dérogations accordées au cas par cas par le ministre si cela est scientifiquement justifié.

Article R214-109

Toujours afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, toutes les procédures expérimentales doivent être menées sous anesthésie ou analgésique ou autre méthode appropriée. Si l'utilisation d'anesthésique ou analgésique est incompatible avec le projet expérimental, cela doit faire l'objet d'une demande d'autorisation spécifique.

A toutes les étapes de la procédure, la douleur et l'angoisse de l'animal doivent être réduites autant que possible, tant que ça n'interfère pas avec l'objectif de l'étude (si tel est le cas, une justification scientifique sera demandée en amont).

Article R214-110

« Une procédure expérimentale est réputée terminée lorsque aucune observation ne doit plus être faite. » En fin de procédure, c'est normalement le vétérinaire, ou à défaut une personne compétente désignée par le responsable du projet, qui décide du sort de l'animal. Si l'animal est gardé en vie, il doit être correctement hébergé et recevoir des soins adaptés à son état de santé.

Article R214-111

« Un animal n'est pas gardé en vie à l'issue d'une procédure expérimentale s'il est susceptible de continuer à éprouver une douleur, une souffrance ou une angoisse ou de subir l'effet de dommages durables [...] »

Il n'y a donc aucune obligation à garder l'animal en vie en fin de procédure. Dans certains cas, lorsque l'animal est susceptible d'éprouver des dommages durables, il est conseillé de le mettre à mort.

Article R214-112

Comme nous le verrons plus tard dans la partie « Réhabilitation », les animaux peuvent être placés dans des lieux d'accueils ou remis en liberté, sur décision du préfet du département du lieu de placement. Il existe trois conditions cumulatives pour que ce placement soit autorisé :

- L'état de santé de l'animal, certifié par un vétérinaire, le permet
- Il n'existe aucun danger pour la santé publique, la santé animale et l'environnement
- Des mesures appropriées ont été prises pour préserver son bien-être

Les établissements doivent au préalable s'assurer de la réadaptation des animaux qu'ils placent, par le biais d'un programme de socialisation.

Article R214-113

La réutilisation d'animaux ayant déjà participé à des procédures expérimentales est possible sous plusieurs conditions, afin d'éviter d'utiliser un « nouvel » animal (principe de réduction) :

- La gravité réelle des procédures expérimentales précédentes était de classe légère ou modérée (voir Article R214-122)
- Il est démontré que l'animal a pleinement recouvré son état de santé et de bien-être général
- La gravité de la nouvelle procédure expérimentale est de classe légère, modérée ou sans réveil
- Un avis favorable a été donné par un vétérinaire en prenant en considération le sort de l'animal concerné sur toute sa durée de vie

Ainsi, un animal peut participer à plusieurs procédures expérimentales classées légères ou modérées. Cela vise à réduire le nombre total d'animaux utilisés.

ii. Compétences requises pour concevoir ou réaliser des procédures expérimentales sur les animaux

Article R214-114

Tous les établissements qui hébergent des animaux destinés à des procédures scientifiques (qu'ils soient utilisateur, éleveur ou fournisseurs) doivent avoir un personnel qualifié et en nombre suffisant.

Article R214-115

C'est le ministre chargé de l'agriculture et de la recherche, ainsi que le ministre de la défense, qui fixent par arrêté conjoint le niveau d'études et de formation nécessaire pour concevoir et réaliser des procédures expérimentales.

f. Autorisation des projets (R214-117 à 126)

i. Comités d'éthiques en expérimentation animale et évaluation éthique des projets

Article R214-117

Le rôle des comités éthiques en expérimentation animale (CEEA) est d'évaluer tous les projets expérimentaux utilisant des animaux. A cette fin, chaque établissement doit dépendre d'un seul comité éthique (mais un comité éthique peut évaluer pour plusieurs établissements).

C'est le ministre chargé de la recherche qui donne l'agrément au comité éthique.

« Pour être agréé, un comité doit :

- Justifier de la compétence pluridisciplinaire de ses membres
- Garantir le respect de la charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale mentionnée à l'article R214-134
- Garantir le respect des principes relatifs à l'évaluation éthique
- Présenter des garanties d'indépendance et d'impartialité

- Disposer des moyens de fonctionnement permettant de réaliser l'évaluation éthique des projets dans les délais impartis. »

C'est donc au comité éthique que revient la charge d'évaluer la pertinence et l'acceptabilité éthique du projet expérimental impliquant des animaux vivants. Ils transmettront ainsi leur avis à l'équipe chargée du projet, et pourront retravailler certains éléments du projet si nécessaire.

Article R214-118

Les comités éthiques doivent être composés d'au moins un vétérinaire, d'un chercheur, d'un expérimentateur, d'un animalier, et d'une personne du corps social non impliquée dans les activités de recherche. Si une personne présente un conflit d'intérêt dans le projet qu'elle est censée évaluer, elle ne peut participer à la délibération.

Article R214-119

L'évaluation éthique des projets doit vérifier que le projet satisfait aux critères suivants :

- Le projet est justifié du point de vue scientifique ou éducatif, ou requis par la loi
- Les objectifs justifient l'utilisation des animaux
- Le projet est conçu pour permettre le déroulement des procédures expérimentales dans les conditions les plus respectueuses de l'animal et de l'environnement

Article R214-120

Le comité éthique peut demander une appréciation rétrospective une fois le projet terminé. C'est notamment obligatoire pour les projets utilisant des primates ou impliquant des procédures de classe sévère (ce n'est pas le cas pour les classes légères et sans réveil).

Article R214-121

L'autorisation de projet et l'évaluation éthique du projet doivent être conservés par l'établissement utilisateur pendant au moins cinq ans.



Pour en savoir plus au sujet des comités d'éthique en France et à l'étranger

ii. Demande d'autorisation

Article R214-122

Tout projet expérimental impliquant des animaux doit obtenir une autorisation accordée par le ministre chargé de la recherche. La demande d'autorisation doit préciser la classe de sévérité des procédures du projet.

Article R214-123

« L'autorisation ne peut être accordée à un projet que s'il a fait l'objet d'une évaluation éthique favorable. »

L'autorisation est ensuite accordée pour une durée maximale de cinq ans.

Article R214-124

Le ministère chargé de la recherche communiquera avec le responsable du projet pour la réception de la demande d'autorisation et en cas de demande incomplète ou erronée

Article R214-125

« La décision concernant une autorisation de projet est notifiée au plus tard huit semaines après la réception de la demande complète et correcte. Ce délai inclut celui de l'évaluation éthique du projet qui ne peut être supérieure à sept semaines. »

Dans certains cas particuliers, le comité éthique peut demander un délai supplémentaire.

Article R214-126

« Toute modification du projet qui pourrait avoir une incidence négative sur le bien-être des animaux fait l'objet d'une nouvelle demande d'autorisation.

L'octroi d'une nouvelle autorisation de projet s'appuie sur un nouveau résultat favorable de l'évaluation éthique du projet. »

« Le ministre chargé de la recherche peut retirer l'autorisation de projet lorsque celui-ci n'est pas exécuté en conformité avec l'autorisation. »

g. Organismes nationaux (R214-130 à 137)

i. Commission nationale pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques

Article R214-130

La Commission nationale pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques a pour rôle de donner son avis sur tout projet de modification de la législation relative à l'expérimentation animale. C'est un organisme consultatif qui peut également être consulté pour l'élevage des animaux à des fins scientifiques, le transport des animaux, la formation des personnes utilisant des animaux à des fins scientifiques, la validation de méthodes alternatives, etc.

Article R214-131

« La Commission nationale pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques est aussi chargée :

- De conseiller les autorités compétentes et les structures chargées du bien-être des animaux sur des questions en rapport avec l'acquisition, l'élevage, l'hébergement, les soins et l'utilisation des animaux dans les procédures expérimentales et de veiller au partage des meilleures pratiques ;
- D'échanger des informations sur le fonctionnement des structures chargées du bien-être des animaux et sur les évaluations de projets avec les comités

nationaux des autres États membres afin de partager les meilleures pratiques au sein de l'Union européenne. »

Article R214-132

Le président de la commission est nommé par les ministres chargés de l'agriculture et de la recherche, pour une durée de cinq ans renouvelables.

La commission est composée, en plus du président, de :

- Huit représentants de l'État : directeurs chargés de la recherche au ministère, de la santé et de la protection animale au ministère de l'agriculture, de l'enseignement supérieur au ministère de l'enseignement supérieur, de l'enseignement scolaire au ministère chargé de l'éducation nationale, le directeur général de la santé, le directeur chargé de l'industrie, le directeur chargé de la protection de la nature, et le directeur central du service de santé des armées.
- Quinze personnalités nommées par les ministres chargés de l'agriculture et de la recherche pour cinq ans renouvelables : 3 représentants du secteur de la recherche publique, 3 représentants des organisations représentatives du secteur industriel privé, 6 représentants d'organisations de protection animale, 3 représentants des professions de l'expérimentation animale.

Article R214-133

La commission se réunit au moins deux fois par an et peut être réunie exceptionnellement à la demande du ministère chargé de l'environnement, de l'agriculture, de la recherche et de la santé.

ii. **Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale**

Article R214-134

« Ce comité a pour mission d'émettre des avis sur les questions éthiques soulevées par l'expérimentation animale.

Il est chargé notamment :

- D'élaborer, de publier et d'actualiser s'il en est besoin une charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale et de faire toute proposition sur sa mise en application ;
- De conduire l'élaboration et la mise à jour d'un guide de bonnes pratiques de fonctionnement des comités d'éthique ;
- D'établir le bilan annuel national d'activité des comités d'éthique et de formuler des recommandations visant à améliorer leurs pratiques ;
- D'adresser à la Commission nationale pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques toute recommandation de méthode susceptible d'améliorer le bien-être des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques. »

La commission nationale a un rôle dans la législation relative à l'expérimentation animale, alors que le comité a un rôle de réflexion sur l'éthique de l'expérimentation animale, et sur l'élaboration de recommandations. Dans les deux cas, il s'agit d'organismes consultatifs.

Article R214-135

La composition du comité est la suivante :

- Son président
- Deux représentants de l'État : le directeur chargé de la recherche, le directeur chargé de la santé et de la protection animale
- Deux personnalités qualifiées du domaine de l'expérimentation animale choisies dans le secteur public de la recherche et de l'enseignement supérieur
- Une personnalité du secteur médical exerçant en milieu hospitalier
- Une personnalité du secteur vétérinaire
- Trois personnalités désignées sur proposition d'organisations de protection animale

Les membres sont nommés pour cinq ans par le ministre chargé de l'agriculture et celui de la recherche.

Article R214-136

Comme pour la Commission, le Comité se réunit deux fois par an, voire plus à la demande du ministère ou de ses membres.

Article R214-137

Les membres de la commission et du comité exercent leurs fonctions à titre gratuit.

XI. Sources

1. Article 515-14 - Code civil - Légifrance [Internet]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000030250342/2021-12-10
2. Von Staden H. La théorie de la vision chez Galien : la colonne qui saute et autres énigmes. *Philosophie antique Problèmes, Renaissances, Usages*. 1 nov 2012;(12):115-55.
3. Chapouthier G. L'évolution de l'expérimentation animale : Claude Bernard et la période-clé du XIXe siècle. :10.
4. Mendes H. Claude Bernard et l'origine de l'expérimentation animale moderne. *Bibnum Textes fondateurs de la science* [Internet]. 1 août 2012 [cité 13 sept 2022]; Disponible sur: <https://journals.openedition.org/bibnum/532>
5. Bernard C. Introduction à l'étude de la médecine expérimentale [Internet]. Paris: Flammarion; 2013. 384 p. (Champs Classiques). Disponible sur: <https://www.cairn.info/introduction-a-l-etude-de-la-medecine-experimental--9782081307582.htm>
6. CRETTEZ VON ROTEN F. Expérimentation animale - Analyse de la controverse de 1950 à nos jours en Suisse. *Alphil*. 2019.
7. La réglementation et le dispositif éthique de l'expérimentation animale · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 24 déc 2022]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/modeles-animaux/reglementation-et-dispositif-ethique-experimentation-animale/>
8. Collins DF. Of Mice, Men, and Medicine [Internet]. NIH Director's Blog. 2013 [cité 11 nov 2022]. Disponible sur: <https://directorsblog.nih.gov/2013/02/19/of-mice-men-and-medicine/>
9. ALLOUCHE-SAADA G Myriam, Esther. Eléments de caractérisation de modèles transgéniques utilisés en recherche biomédicale. 2009.
10. Notes-explicatives.pdf [Internet]. [cité 21 juill 2022]. Disponible sur: https://www.ccac.ca/Documents/Education_fr/Modules/Vivarium/Recherche_biomedicale/Notes-explicatives.pdf
11. Microbiote intestinal (flore intestinale) · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 25 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/microbiote-intestinal-flore-intestinale/>
12. Bouterin V, Piastra-Facon F, Risson E. Le microbiote intestinal, un modulateur clé de la physiologie immunitaire. *Med Sci (Paris)*. 1 juin 2019;35(6-7):571-4.
13. Rivière P. Le microbiote intestinal : acteur incontournable de la régulation du fer dans notre organisme [Internet]. Salle de presse de l'Inserm. 2015 [cité 25 mai 2023]. Disponible sur: <https://presse.inserm.fr/le-microbiote-intestinal-acteur-incontournable-de-la-regulation-du-fer-dans-notre-organisme/20611/>
14. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 31 janv 2013;368(5):407-15.
15. Le statut sanitaire du modèle « rongeur » en recherche [Internet]. [cité 25 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.ram.cnrs.fr/index.php/acutalites-biocampus/actualites-biocampus/321-le-statut-sanitaire-du-modele-rongeur-en-recherche>
16. Dauchy RT, Sauer LA, Blask DE, Vaughan GM. Light contamination during the dark phase in « photoperiodically controlled » animal rooms: effect on tumor growth and metabolism in rats. *Lab Anim Sci*. oct 1997;47(5):511-8.
17. Hemsworth PH, Barnett JL, Hansen C. The influence of handling by humans on the behaviour, reproduction and corticosteroids of male and female pigs. *Applied Animal Behaviour Science*. 1 juill 1986;15(4):303-14.
18. 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.
19. RAPPORT DE LA COMMISSION AU CONSEIL ET AU PARLEMENT EUROPÉEN SUR

LES STATISTIQUES CONCERNANT LE NOMBRE D'ANIMAUX UTILISÉS À DES FINS EXPÉRIMENTALES ET À D'AUTRES FINS SCIENTIFIQUES DANS LES ÉTATS MEMBRES DE L'UNION EUROPÉENNE.pdf.

20. ALURES - European Commission [Internet]. [cité 25 mai 2023]. Disponible sur: https://webgate.ec.europa.eu/envdataportal/content/alures/section2_number-of-uses.html
21. Enquete statistique 2021 - Animaux utilisés à des fins scientifiques.pdf.
22. Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 5 déc 2002;420(6915):520-62.
23. Breschi et al. - 2017 - Comparative transcriptomics in human and mouse.pdf.
24. La pénicilline protège les souris de l'infection | ari.info [Internet]. ari.info. [cité 21 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.animalresearch.info/fr/avancees-medicales/chronologie/la-penicilline-protege-les-souris-de-linfection/>
25. Johnson M. Laboratory Mice and Rats. Materials and Methods [Internet]. 8 juill 2022 [cité 21 juill 2022]; Disponible sur: <https://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>
26. MGI-Guidelines for Nomenclature of Mouse and Rat Strains [Internet]. [cité 23 juill 2022]. Disponible sur: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml>
27. Souris C57BL/6 | Charles River [Internet]. [cité 29 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.criver.com/fr/products-services/modeles-de-recherche-et-services/souris-c57bl6?region=29>
28. Souris C57BL/6JRj [Internet]. Janvier-Labs. [cité 29 mai 2023]. Disponible sur: https://janvier-labs.com/fiche_produit/2-c57bl-6jrj/
29. Russell JS, Griffith TA, Helman T, Du Toit EF, Peart JN, Headrick JP. Chronic type 2 but not type 1 diabetes impairs myocardial ischaemic tolerance and preconditioning in C57BL/6 mice. *Exp Physiol*. déc 2019;104(12):1868-80.
30. A BK, M K, B B, J S, W L. Effect of some antipsychotic drugs on immunoreactivity in C57BL/6 mice. *Polish journal of pharmacology* [Internet]. déc 2002 [cité 29 mai 2023];54(6). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12866735/>
31. Urs S. B16-F10 : un modèle de mélanome murin [Internet]. 2019 [cité 29 mai 2023]. Disponible sur: <https://fr.drugdevelopment.labcorp.com/industry-solutions/oncology/preclinical/tumor-spotlights/b16-f10-a-murine-melanoma-model.html>
32. JAX NOTES: A Brief History of the Two Substrains of BALB/c, BALB/cJ, and BA - The Jackson Laboratory [Internet]. 2011 [cité 21 juill 2022]. Disponible sur: <https://web.archive.org/web/20110619092710/http://jaxmice.jax.org/jaxnotes/archive/443a.html>
33. Mormede P, Guy N, Médale F, Nivet-Antoine V, Gonin P, Picavet S, et al. Avis sur l'utilisation d'anticorps d'origine animale ou non animale. Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale; 2022.
34. Joubert S, Dodelet V, Béliard R, Durocher Y. La bioproduction des anticorps monoclonaux. *Med Sci (Paris)*. 1 déc 2019;35(12):1153-9.
35. Janvier-Labs. Souris BALB/cByJRj [Internet]. Janvier-Labs. [cité 21 juill 2022]. Disponible sur: https://janvier-labs.com/fiche_produit/balb-cbyjrj-souris/
36. Bienenstock J, Kunze W, Forsythe P. Microbiota and the gut-brain axis. *Nutrition Reviews*. 1 août 2015;73(suppl_1):28-31.
37. Visentin V. Mise en place d'un modèle d'étude chez la souris de l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs pour l'évaluation de stratégies thérapeutiques. 27 févr 2012;112.
38. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*. févr 1983;301(5900):527-30.
39. Fox Chase SCID Mouse | Charles River [Internet]. [cité 21 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.criver.com/products-services/find-model/fox-chase-scid-mouse?region=29>

40. Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature*. 15 sept 1988;335(6187):256-9.
41. Laboratories CR. The CB17/Icr-Prkdc(scid)/IcrIcoCrl Mouse: A Fox Chase SCID® (Severe Combined Immunodeficiency) Model. :2.
42. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol*. 1 janv 1995;154(1):180-91.
43. Cachat A, Villaudy J, Rigal D, Gazzolo L, Duc Dodon M. Les souris ne sont pas des hommes et pourtant...: Ce que les souris humanisées nous apprennent sur les maladies infectieuses. *Med Sci (Paris)*. janv 2012;28(1):63-8.
44. Berges BK, Wheat WH, Palmer BE, Connick E, Akkina R. HIV-1 infection and CD4 T cell depletion in the humanized Rag2^{-/-}-gamma c^{-/-} (RAG-hu) mouse model. *Retrovirology*. 1 nov 2006;3:76.
45. TAURINES C. Souris Athymic Nude immunodéficiente [Internet]. Janvier-Labs. [cité 23 juill 2022]. Disponible sur: https://janvier-labs.com/fiche_produit/athymic_nude-souris/
46. Low-Marchelli J, Ph.D. Experimental design: Top four strategies for reproducible mouse research [Internet]. The Jackson Laboratory. [cité 23 juill 2022]. Disponible sur: <https://front.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2016/march/experimental-design-top-four-strategies-for-reproducible-mouse-research>
47. Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*. avr 2004;428(6982):493-521.
48. Roux E. La physiologie des animaux de laboratoire. :54.
49. rats.pdf [Internet]. [cité 23 juill 2022]. Disponible sur: https://ccac.ca/Documents/Normes/Lignes_directrices/Vol2/rats.pdf
50. Lewerenz HJ. J. E. Harkness und J. E. Wagner: The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents. 152 Seiten. Lea and Febinger, Philadelphia 1977. Preis: 8,- \$. Food / Nahrung. 1979;23(1):99-99.
51. Jeanblanc J, Rolland B, Gierski F, Martinetti MP, Naassila M. Animal models of binge drinking, current challenges to improve face validity. *Neurosci Biobehav Rev*. nov 2019;106:112-21.
52. Weber K. Differences in Types and Incidence of Neoplasms in Wistar Han and Sprague-Dawley Rats. *Toxicol Pathol*. janv 2017;45(1):64-75.
53. TAURINES C. Rat SPRAGUE DAWLEY® [Internet]. Janvier-Labs. [cité 23 juill 2022]. Disponible sur: https://janvier-labs.com/fiche_produit/sprague_dawley-rat/
54. Suzuki H, Mohr U, Kimmerle G. Spontaneous endocrine tumors in Sprague-Dawley rats. *J Cancer Res Clin Oncol*. oct 1979;95(2):187-96.
55. Cho JH, Cho DC, Yu SH, Jeon YH, Sung JK, Kim KT. Effect of dietary calcium on spinal bone fusion in an ovariectomized rat model. *J Korean Neurosurg Soc*. oct 2012;52(4):281-7.
56. Fang J, Yang L, Zhang R, Zhu X, Wang P. Are there differences between Sprague-Dawley and Wistar rats in long-term effects of ovariectomy as a model for postmenopausal osteoporosis? *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(2):1491-502.
57. Bortell R, Yang C. The BB rat as a model of human type 1 diabetes. *Methods Mol Biol*. 2012;933:31-44.
58. Zipris D, Hillebrands JL, Welsh RM, Rozing J, Xie JX, Mordes JP, et al. Infections that induce autoimmune diabetes in BBDR rats modulate CD4⁺CD25⁺ T cell populations. *J Immunol*. 1 avr 2003;170(7):3592-602.
59. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. avr 2013;496(7446):498-503.

60. Mokalled MH, Patra C, Dickson AL, Endo T, Stainier DYR, Poss KD. Injury-induced ctgfa directs glial bridging and spinal cord regeneration in zebrafish. *Science*. 4 nov 2016;354(6312):630-4.
61. The secret lives of Drosophila flies [Internet]. The secret lives of Drosophila flies. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4454838/>
62. Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 24 mars 2000;287(5461):2185-95.
63. Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature*. 1 sept 2005;437(7055):69-87.
64. Barriel V. Ces 1,4% qui nous séparent des chimpanzés ! *Med Sci (Paris)*. 1 oct 2004;20(10):859-61.
65. STAT2018_Utilisation_animaux_fins_scientifiques_1287557.pdf [Internet]. [cité 23 juill 2022]. Disponible sur: https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/sites/default/files/content_migration/document/STAT2018_Utilisation_animaux_fins_scientifiques_1287557.pdf
66. Jarraya B, Boulet S, Ralph GS, Jan C, Bonvento G, Azzouz M, et al. Dopamine gene therapy for Parkinson's disease in a nonhuman primate without associated dyskinesia. *Sci Transl Med*. 14 oct 2009;1(2):2ra4.
67. Novembre FJ, Saucier M, Anderson DC, Klumpp SA, O'Neil SP, Brown CR, et al. Development of AIDS in a chimpanzee infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. mai 1997;71(5):4086-91.
68. La recherche fondamentale · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 8 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/nos-recherches/recherche-fondamentale/>
69. The R&D Cost of a New Medicine [Internet]. 2012 [cité 21 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.ohe.org/publications/rd-cost-new-medicine>
70. Recherche et développement [Internet]. [cité 21 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.leem.org/recherche-et-developpement>
71. Larousse É. Définitions : génotoxicité - Dictionnaire de français Larousse [Internet]. [cité 8 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/g%C3%A9notoxicit%C3%A9/186411>
72. S2 - EVALUATION DE LA GENOTOXICITE DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES DESTINES A L'UTILISATION HUMAINE ET INTERPRETATION DES DONNÉES.pdf.
73. Greenwood SK, Hill RB, Sun JT, Armstrong MJ, Johnson TE, Gara JP, et al. Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the in vitro assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results. *Environ Mol Mutagen*. 2004;43(1):36-44.
74. Sécurité et essais | ari.info [Internet]. ari.info. [cité 21 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.animalresearch.info/fr/mise-au-point-de-medicaments/securite-et-essais/>
75. Moser VC. Observational Batteries in Neurotoxicity Testing. *Int J Toxicol*. 1 nov 2000;19(6):407-11.
76. Irwin Test - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [cité 21 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/irwin-test>
77. Canada S. S10 : Évaluation du potentiel phototoxique des produits pharmaceutiques [Internet]. 2016 [cité 21 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/medicaments-produits-sante/medicaments/demandes-presentations/lignes-directrices/international-conference-harmonisation/innocuite/evaluation-potentiel-phototoxique-produits-pharmaceutiques.html>
78. Développement du médicament · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 21 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/medicament-developpement/>
79. McCulloch M, Jezierski T, Broffman M, Hubbard A, Turner K, Janecki T. Diagnostic

Accuracy of Canine Scent Detection in Early- and Late-Stage Lung and Breast Cancers. *Integr Cancer Ther.* 1 mars 2006;5(1):30-9.

80. Thuleau A, Gilbert C, Bauër P, Alran S, Fourchette V, Guillot E, et al. A New Transcutaneous Method for Breast Cancer Detection with Dogs. *Oncology.* 2019;96(2):110-3.

81. Piqueret B, Bourachot B, Leroy C, Mechta-Grigoriou F, d’Ettorre P, Sandoz JC. Ants detect cancer cells through volatile organic compounds: *iScience.* *iScience* [Internet]. 2022 [cité 19 août 2022]; Disponible sur: [https://www.cell.com/iscience/fulltext/S2589-0042\(22\)00229-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2589004222002292%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/iscience/fulltext/S2589-0042(22)00229-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2589004222002292%3Fshowall%3Dtrue)

82. Insuline100: La découverte et le développement [Internet]. Moments Déterminants Canada. [cité 3 sept 2022]. Disponible sur: <https://definingmomentscanada.ca/fr/insuline100/timeline/>

83. Lee SH, Yoon KH. A Century of Progress in Diabetes Care with Insulin: A History of Innovations and Foundation for the Future. *Diabetes Metab J.* sept 2021;45(5):629-40.

84. Wockhardt. Hypurin® [Internet]. Wockhardt. [cité 6 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.wockhardt.co.uk/medicines/patients/hypurin/>

85. La production d’anticorps | ari.info [Internet]. ari.info. [cité 6 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.animalresearch.info/fr/concevoir-la-recherche/conception-et-analyse-de-lexperimentation/la-production-danticorps/>

86. Les xénogreffes finiront-elles par être acceptées ? | médecine/sciences [Internet]. [cité 8 juin 2023]. Disponible sur: https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2005/03/medsci2005213p302/medsci2005213p302.html#R13

87. Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, et al. Production of α -1,3-Galactosyltransferase Knockout Pigs by Nuclear Transfer Cloning. *Science.* 8 févr 2002;295(5557):1089-92.

88. Houser SL, Kuwaki K, Knosalla C, Dor FJMF, Gollackner B, Cheng J, et al. Thrombotic microangiopathy and graft arteriopathy in pig hearts following transplantation into baboons. *Xenotransplantation.* 2004;11(5):416-25.

89. Gordon CJ. *Temperature Regulation in Laboratory Rodents* [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press; 1993 [cité 13 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.cambridge.org/core/books/temperature-regulation-in-laboratory-rodents/EE8C115D85961B3CB13BA80B0E5D0486>

90. Gonzalez RR, Kluger MJ, Hardy JD. Partitional calorimetry of the New Zealand white rabbit at temperatures 5-35 degrees C. *Journal of Applied Physiology.* nov 1971;31(5):728-34.

91. Crippa L, Gobbi A, Ceruti RM, Clifford CB, Remuzzi A, Scanziani E. Ringtail in suckling Munich Wistar Fromter rats: a histopathologic study. *Comp Med.* oct 2000;50(5):536-9.

92. Dauchy RT, Dauchy EM, Hanifin JP, Gauthreaux SL, Mao L, Belancio VP, et al. Effects of Spectral Transmittance through Standard Laboratory Cages on Circadian Metabolism and Physiology in Nude Rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* mars 2013;52(2):146-56.

93. Bellhorn RW. Lighting in the animal environment. *Lab Anim Sci.* avr 1980;30(2 Pt 2):440-50.

94. Rasmussen S, Glickman G, Norinsky R, Quimby FW, Tolwani RJ. Construction Noise Decreases Reproductive Efficiency in Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* juill 2009;48(4):363-70.

95. Peterson EA, Augenstein JS, Tanis DC, Augenstein DG. Noise raises blood pressure without impairing auditory sensitivity. *Science.* 27 mars 1981;211(4489):1450-2.

96. Nayfield KC, Besch EL. Comparative responses of rabbits and rats to elevated noise. *Lab Anim Sci.* août 1981;31(4):386-90.

97. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. *Manuel sur le soin et l’utilisation des animaux d’experimentation.* 2e ed. Ottawa: Conseil canadien de protection des animaux; 1993.

98. Manser CE, Morris TH, Broom DM. An investigation into the effects of solid or grid cage

- flooring on the welfare of laboratory rats. *Lab Anim.* oct 1995;29(4):353-63.
99. Garner JP. Stereotypies and other abnormal repetitive behaviors: potential impact on validity, reliability, and replicability of scientific outcomes. *ILAR J.* 2005;46(2):106-17.
100. Augustsson H, Lindberg L, Höglund AU, Dahlborn K. Human-animal interactions and animal welfare in conventionally and pen-housed rats. *Lab Anim.* 1 juill 2002;36(3):271-81.
101. Newberry RC. Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Applied Animal Behaviour Science.* 1 sept 1995;44(2):229-43.
102. Würbel H. Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization. 2007;9.
103. Baumans V, Van Loo PLP. How to improve housing conditions of laboratory animals: The possibilities of environmental refinement. *The Veterinary Journal.* 1 janv 2013;195(1):24-32.
104. Olsson IAS, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of « environmental enrichment ». *Lab Anim.* juill 2002;36(3):243-70.
105. Kuleskaya N, Rauvala H, Voikar V. Evaluation of Social and Physical Enrichment in Modulation of Behavioural Phenotype in C57BL/6J Female Mice. *PLOS ONE.* 8 sept 2011;6(9):e24755.
106. Van Loo PLP, Baumans V. The importance of learning young: the use of nesting material in laboratory rats. *Lab Anim.* janv 2004;38(1):17-24.
107. Manser CE, Broom DM, Overend P, Morris TH. Operant studies to determine the strength of preference in laboratory rats for nest-boxes and nesting materials. *Lab Anim.* 1 janv 1998;32(1):36-41.
108. Hubrecht R. Comfortable quarters for laboratory animals, ninth edition [Internet]. Reinhardt V and Reinhardt A (eds). Animal Welfare Institute: Washington, DC; 2002. Disponible sur: <http://www.awionline.org/pubs/cq02/Cq-dogs.html>
109. The Domestic Cat - The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals - Wiley Online Library [Internet]. [cité 30 sept 2022]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781444318777.ch31>
110. Poole T. Happy animals make good science. *Lab Anim.* avr 1997;31(2):116-24.
111. Brain P, Beden S. Beden, S.N. and Brain, P.F. (1984). Effects of attack-related stress on the primary immune response to sheep red blood cells in castrated mice. *IRCS Medical Science* 12: 675. *IRCS journal of medical science.* 1 janv 1984;12:675.
112. Rammal H, Bouayed J, Falla J, Boujedaini N, Soulimani R. The Impact of High Anxiety Level on Cellular and Humoral Immunity in Mice. *Neuroimmunomodulation.* 2010;17(1):1-8.
113. Fleshner M, Crane CR. Exosomes, DAMPs and miRNA: Features of Stress Physiology and Immune Homeostasis. *Trends in Immunology.* oct 2017;38(10):768-76.
114. Swennes AG, Alworth LC, Harvey SB, Jones CA, King CS, Crowell-Davis SL. Human handling promotes compliant behavior in adult laboratory rabbits. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* janv 2011;50(1):41-5.
115. Bayne KAL. Environmental Enrichment of Nonhuman Primates, Dogs and Rabbits Used in Toxicology Studies. *Toxicol Pathol.* 1 janv 2003;31(1_suppl):132-7.
116. Animals NRC (US) C on R and A of P in L. Pain in Research Animals: General Principles and Considerations [Internet]. Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. National Academies Press (US); 2009 [cité 21 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32655/>
117. Enquête sur les animaux non utilisés dans des procédures expérimentales en 2017 : de nouveaux chiffres [Internet]. [cité 27 oct 2022]. Disponible sur: https://cache.media.enseignementsup-recherche.gouv.fr/file/utilisation_des_animaux_fins_scientifiques/82/5/Commentaire_sur_animaux_n_on_utilises_dans_les_procedures_1252825.pdf
118. AVMA guidelines for the euthanasia of animals [Internet]. American Veterinary Medical Association. 2020 [cité 27 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.avma.org/resources-tools/avma->

policies/avma-guidelines-euthanasia-animals

119. Arnold M, Langhans W. Effects of anesthesia and blood sampling techniques on plasma metabolites and corticosterone in the rat. *Physiology & Behavior*. avr 2010;99(5):592-8.
120. Rp T, Ej K, As L, Er R, Ms G, R RA, et al. Euthanasia by CO₂ inhalation affects potassium levels in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* [Internet]. mai 2010 [cité 27 oct 2022];49(3). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20587163/>
121. Svendsen O, Kok L, Lauritzen B. Nociception after intraperitoneal injection of a sodium pentobarbitone formulation with and without lidocaine in rats quantified by expression of neuronal c-fos in the spinal cord--a preliminary study. *Lab Anim*. avr 2007;41(2):197-203.
122. Cartner SC, Barlow SC, Ness TJ. Loss of cortical function in mice after decapitation, cervical dislocation, potassium chloride injection, and CO₂ inhalation. *Comp Med*. déc 2007;57(6):570-3.
123. Vanderwolf CH, Buzsaki G, Cain DP, Cooley RK, Robertson B. Neocortical and hippocampal electrical activity following decapitation in the rat. *Brain Res*. 7 juin 1988;451(1-2):340-4.
124. Flecknell PA, Roughan JV, Hedenqvist P. Induction of anaesthesia with sevoflurane and isoflurane in the rabbit. *Lab Anim*. janv 1999;33(1):41-6.
125. Köhler A, Collymore C, Finger-Baier K, Geisler R, Kaufmann L, Pounder KC, et al. Report of Workshop on Euthanasia for Zebrafish-A Matter of Welfare and Science. *Zebrafish*. déc 2017;14(6):547-51.
126. Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, et al. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ*. 25 janv 2007;334(7586):197.
127. Pound P, Nicol CJ. Retrospective harm benefit analysis of pre-clinical animal research for six treatment interventions. *PLoS One*. 28 mars 2018;13(3):e0193758.
128. Van Norman GA. Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials. *JACC Basic Transl Sci*. 25 nov 2019;4(7):845-54.
129. Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov*. août 2004;3(8):711-6.
130. Bailey J, Thew M, Balls M. An analysis of the use of dogs in predicting human toxicology and drug safety. *Altern Lab Anim*. nov 2013;41(5):335-50.
131. Bailey J, Thew M, Balls M. An analysis of the use of animal models in predicting human toxicology and drug safety. *Altern Lab Anim*. juin 2014;42(3):181-99.
132. van Meer PJK, Kooijman M, Gispens-de Wied CC, Moors EHM, Schellekens H. The ability of animal studies to detect serious post marketing adverse events is limited. *Regul Toxicol Pharmacol*. déc 2012;64(3):345-9.
133. Green SB. Can animal data translate to innovations necessary for a new era of patient-centred and individualised healthcare? Bias in preclinical animal research. *BMC Med Ethics*. 28 juill 2015;16:53.
134. Médicaments : les coûts explosifs de la R&D – PharmAnalyses [Internet]. [cité 3 déc 2022]. Disponible sur: <https://pharmanalyses.fr/medicaments-les-couts-explosifs-de-la-rd/>
135. Sertkaya A, Wong HH, Jessup A, Beleche T. Key cost drivers of pharmaceutical clinical trials in the United States. *Clinical Trials*. 1 avr 2016;13(2):117-26.
136. Bottini AA, Hartung T. Food for thought ... on the economics of animal testing. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*. 1 févr 2009;26(1):3-16.
137. Costs of Animal and Non-Animal Testing [Internet]. Humane Society International. 2012 [cité 7 déc 2022]. Disponible sur: https://www.hsi.org/news-media/time_and_cost/
138. Essai n° 405 : Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux | READ online [Internet]. [cité 16 déc 2022]. Disponible sur: https://read.oecd-ilibrary.org/environment/essai-n-405-effet-irritant-corrosif-aigu-sur-les-yeux_9789264185548-fr

139. Essai n°467 : Approches définies pour les lésions oculaires graves et l'irritation oculaire | READ online [Internet]. oecd-ilibrary.org. [cité 16 déc 2022]. Disponible sur: https://read.oecd-ilibrary.org/environment/essai-n-467-approches-definies-pour-les-lesions-oculaires-graves-et-l-irritation-oculaire_edel1d11b-fr
140. Essai n° 442C: Sensibilisation cutanée in chemico: Essai portant sur l'événement clé relatif à l'établissement d'une liaison covalente avec les protéines, dans la voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables | READ online [Internet]. oecd-ilibrary.org. [cité 16 déc 2022]. Disponible sur: https://read.oecd-ilibrary.org/environment/essai-n-442c-sensibilisation-cutanee-in-chemico_9789264229723-fr
141. Le Graal - Refuges partenaires [Internet]. [cité 19 janv 2023]. Disponible sur: https://www.graal-defenseanimale.org/content/refuges_partenaires.php
142. Le Graal - Qui sommes nous ? [Internet]. [cité 19 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.graal-defenseanimale.org/content/presentation.php>
143. Explication [Internet]. [cité 19 janv 2023]. Disponible sur: <https://one-voice.fr/fr/nos-combats/experimentation-animale/explication.html>
144. Les conséquences de l'expérimentation animale sur la santé humaine [Internet]. Antidote Europe. [cité 19 janv 2023]. Disponible sur: <https://antidote-europe.eu/pourquoi/>
145. Prix Nobel | ari.info [Internet]. ari.info. [cité 10 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.animalresearch.info/fr/avancees-medicales/prix-nobel/>
146. Bailey J, Thew M, Balls M. Predicting human drug toxicity and safety via animal tests: can any one species predict drug toxicity in any other, and do monkeys help? *Altern Lab Anim.* déc 2015;43(6):393-403.

Vu, le Président du jury,

Fabrice Pagniez

Signature ↗

Vu, le Directeur de thèse,

François Lang

Signature ↗

Vu, le Directeur de l'UFR

Prénom étudiant : Amandine

Nom étudiant : Portier

Nom – Prénoms : Portier Amandine

Titre de la thèse : L'Utilisation des animaux dans la recherche pharmaceutique

Résumé de la thèse :

La question de l'expérimentation animale – et de son intérêt pour la recherche pharmaceutique – est devenue un vrai débat d'actualité, avec des avis en règle générale fortement opposés. Cette thèse a donc pour objectif de donner la situation actuelle sur l'utilisation des animaux en recherche pharmaceutique, principalement en France et en Europe, les modèles animaux dont dispose la recherche, et les alternatives réalisables ou non. J'aborderai également la question éthique que pose ce sujet en présentant les grands courants de pensée qu'on peut trouver aujourd'hui. Enfin, un dernier point mais pas des moindres, sera exposé : celle de la retraite des animaux de laboratoire.

MOTS CLES *(6 maximum en majuscules, tous les mots clés doivent être présents dans le résumé)*

EXPERIMENTATION ANIMALE, RECHERCHE PHARMACEUTIQUE, MODELES ANIMAUX, ANIMAUX DE LABORATOIRE

JURY

Directeur : M. Lang François, PU, UFR Des Sciences Pharmaceutiques

Président : M. Pagniez Fabrice, MCU, UFR Des Sciences Pharmaceutiques

Assesseurs : M. Brochard Fabien, pharmacien d'officine, titulaire de la Pharmacie des Mauges, à St Florent le Vieil