

ARTICLE

Les méthodes alternatives à l'expérimentation animale, présent et futur

Francelyne Marano*

Université Paris Cité, CNRS UMR 8251, Biologie fonctionnelle et adaptative, 4, rue Marie-Andrée Lagroua Weill-Hallé, 75205 Paris cedex 13, France

Reçu le 31 août 2023

Résumé – Les méthodes alternatives à l'expérimentation animale sont utilisées en recherche fondamentale et clinique, pour la réalisation d'études à visée réglementaire et d'opérations de criblage en matière de développement de nouvelles molécules. Elles reposent sur des procédures de remplacement *in vitro* (modèles cellulaires) ou *in silico* (modèles mathématiques). Les méthodes alternatives ont été largement promues par la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) qui vise à encadrer l'expérimentation animale. Dans le domaine de la recherche, ces différentes méthodes sont des outils précieux qui permettent de mieux comprendre la physiologie des organismes et les mécanismes d'action des agents chimiques et physiques sur ces derniers.

Mots clés : culture cellulaire, organoïdes, modélisation mathématique, remplacement, validation

Abstract – Alternative methods to animal testing, present and future. Alternative methods to animal testing are used in fundamental and clinical research, for the realization of studies for regulatory purposes, and also screening operations in the development of new molecules. They are based on *in vitro* (cell models) or *in silico* (mathematical models) replacement methods. They have been largely promoted by the 3Rs rule (Replace, Reduce, Refine) which aims at regulating animal experimentation. For biomedical research, these different methods are valuable tools for better understanding the physiology of organisms and the mechanisms of the effects of chemicals and physical agents on them.

Keywords: cell culture, organoids, mathematical modelling, replacement, validation

Introduction

Depuis longtemps l'homme s'est servi de l'animal pour comprendre le fonctionnement du vivant. Au 19^{ème} siècle, Claude Bernard, dans son ouvrage « *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* », prend clairement position pour l'expérimentation animale (Bernard, 1865). Son opinion est sans ambiguïté : « *A-t-on le droit de faire des expériences sur les animaux? Quant à moi, je pense qu'on a ce droit d'une manière entière et absolue* ». Cette position a été celle des chercheurs en biologie et médecine au 19^{ème} siècle et pendant la première partie du 20^{ème} siècle. Cependant les rapports avec l'animal ont peu à peu évolué en passant de l'animal-objet à l'animal doué de sensibilité et digne de respect. Cette évolution s'est produite progressivement au siècle dernier où les expérimentateurs se sont posés de plus en plus de questions

éthiques sur l'utilisation des animaux de laboratoire. Ces questions ont porté à la fois sur la façon de concevoir les expériences et sur la pertinence d'utiliser des animaux s'il était possible de répondre à un questionnement scientifique par d'autres méthodes. La conséquence a été la mise en place progressive d'un encadrement réglementaire très strict de l'expérimentation animale à la fin du 20^{ème} siècle. L'émergence des méthodes alternatives et du concept des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) a été aussi la traduction de cette prise de conscience. Grâce aux avancées de la biologie cellulaire et moléculaire ainsi que des biotechnologies, il est devenu possible de reconstituer en culture des tissus et des organes, en particulier d'origine humaine. Le développement de la bio-informatique a permis de modéliser certaines fonctions physiologiques normales ou pathologiques, de prévoir leur perturbation par des facteurs environnementaux, d'étudier les effets de médicaments grâce au traitement d'une grande quantité de données. Ce sont tous ces facteurs qui ont joué un rôle essentiel dans la réduction de l'utilisation expérimentale

* Auteur correspondant : marano@univ-paris-diderot.fr

des animaux au cours des vingt dernières années. Et actuellement, les méthodes alternatives continuent d'évoluer grâce aux avancées des recherches fondamentales sur les cellules souches, le développement des organoïdes et les applications modernes de l'imagerie du petit animal.

La règle des 3R et les principes fondateurs de Russel et Burch

Le développement de la biologie et de la physiologie au début du 20^{ème} siècle a été accompagné d'une forte augmentation de l'expérimentation animale (Maurin-Blanchet, 2007). Parallèlement, les chercheurs et le grand public se sont de plus en plus préoccupés de la douleur des animaux utilisés à des fins scientifiques. Ce constat a poussé deux chercheurs britanniques, William Russell et Rex Burch, à réfléchir à la façon dont les expérimentateurs devaient concevoir leurs projets et pratiquer leurs expérimentations afin de préserver le mieux possible le bien-être animal. La publication de leur livre intitulé « *The Principles of Humane Experimental Technique* » (Russell & Burch, 1959) a joué un rôle essentiel dans cette prise de conscience collective. C'est dans cet ouvrage que les auteurs proposent la règle des 3R qui signifient *Replacement*, *Reduction*, *Refinement*, largement reprise ensuite, en particulier dans le domaine réglementaire. Elle est devenue le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en Europe et en Amérique du Nord. Ses prescriptions accompagnent tout projet de recherche qui utilise des animaux et doivent être prises en compte par les chercheurs lorsqu'ils envisagent d'utiliser des animaux dans leurs expériences scientifiques (<https://www.inserm.fr/modeles-animaux/qu-est-regle-3-r/>). Le remplacement doit être priorisé sauf si le recours à l'animal vivant est indispensable. La réduction consiste à utiliser un nombre minimal d'animaux pour que le protocole expérimental puisse répondre à la question posée. Le terme raffinement est la mauvaise traduction de *refinement* et recouvre la notion de minimiser la souffrance animale tout en utilisant au mieux les animaux avec les techniques les mieux adaptées et les plus performantes.

Depuis la publication du livre de Russel et Burch, les efforts des chercheurs se sont portés sur l'application la plus optimale des 3R, bien que, dans la conception courante des méthodes alternatives à l'expérimentation animale, le remplacement soit privilégié. C'est le physiologiste David Smyth, dans son livre *Alternatives to Animal Experiments* (Smyth, 1978) qui associe méthodes alternatives et 3R. Ensuite, le terme « méthodes alternatives » a été largement popularisé par le *Frame* (*UK Fund for the Replacement of Animal in Experiment*) qui a aussi joué un rôle fondamental dans la promotion internationale de la règle des 3R. Le remplacement peut être complet par l'utilisation de modèles *in vitro* et de méthodes *in silico* ou partiel à l'aide d'espèces animales considérées comme peu sensibles à la douleur, essentiellement des invertébrés comme *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*

ou l'embryon du poisson-zèbre *Danio rerio*. En 2011, les états membres de l'Union Européenne se sont accordés autour du principe suivant « *Pour toute étude scientifique, avant d'utiliser des animaux dans le cadre autorisé, le responsable du projet doit être en mesure de démontrer que l'utilisation d'animaux vivants est justifiée pour chaque étude individuelle, qu'aucune des alternatives existantes ne peut être utilisée, que le nombre minimum d'animaux est en cohérence avec l'objectif scientifique et que le projet est conçu pour minimiser toute douleur, souffrance, détresse ou préjudice durable.* » (Extrait du document consensus européen des 6 et 7 octobre 2011). Cependant, l'Union européenne (Directive 2010/63/UE, 2010) considérait aussi que, si le développement des méthodes alternatives était fortement recommandé dans les pays membres, l'expérimentation animale « *demeurait nécessaire pour protéger la santé humaine et animale et l'environnement* ». Ce constat n'a pas été remis en cause en 2017 lors du réexamen de la directive et il est fort probable qu'il ne le sera toujours pas dans un futur proche.

Cet article traitera uniquement des méthodes de remplacement complet dites « substitutives ». Cependant, dans l'utilisation de ces méthodes, il est important de considérer qu'en général elles ne permettent pas de répondre aux mêmes questions que l'expérimentation animale. Il faudrait plutôt les considérer, sauf dans certaines approches dont par exemple les études de mutagenèse et de génotoxicité, comme des méthodes complémentaires à l'expérimentation animale permettant de répondre au mieux à la question scientifique posée. Ceci doit être pris en compte lors de la conception des projets afin d'améliorer la qualité et la pertinence des résultats obtenus pour une meilleure transposition à l'homme.

Les méthodes alternatives à l'expérimentation animale, quelle définition ?

Peut-on étudier le fonctionnement d'un organisme complexe tel que l'organisme humain à partir des cellules qui le composent ? Le développement des biotechnologies depuis 50 ans a pu laisser penser qu'on pourrait un jour se passer de l'expérimentation animale. En effet, les progrès considérables dans la connaissance des mécanismes de la différenciation cellulaire permettent d'obtenir tous les types cellulaires à partir des cellules souches embryonnaires ou somatiques. On peut actuellement conserver en culture sur une longue période des tissus, voire des organes, qui maintiennent leurs caractéristiques différenciées et toutes leurs fonctions. L'apport des modèles cellulaires 2D, 3D et des organoïdes, grâce à la connaissance du rôle du micro-environnement et des matrices extracellulaires, a fait évoluer la compréhension du fonctionnement des cellules les plus différenciées : pulmonaires, hépatiques, rénales, glandulaires, nerveuses, immunitaires, sexuelles... Ces méthodes ont permis une importante diminution de l'utilisation de l'expérimentation animale. Cependant, sauf en cosmétologie où seul l'usage des méthodes substitutives est autorisé pour l'évaluation de l'efficacité et de la toxicité des produits

cosmétiques, dans tous les autres domaines de recherche, qu'ils soient fondamentaux ou réglementaires, les approches *in vivo* et *in vitro* sont associées pour la compréhension à la fois analytique et systémique des phénomènes étudiés. Actuellement il n'y a encore qu'un nombre assez réduit de méthodes alternatives qui sont validées d'un point de vue réglementaire afin de pouvoir les utiliser dans les dossiers officiels d'autorisation de mise sur le marché des médicaments et produits de santé comme des phytosanitaires. En particulier, tous les produits chimiques évalués dans le cadre du règlement européen REACH (Enregistrement, évaluation et autorisation des produits chimiques), et qui peuvent agir sur la santé humaine et l'environnement, doivent l'être dans la mesure du possible en utilisant des méthodes alternatives. Un rapport récent de l'*European Chemical Agency* (ECHA) « *analysant les données concernant plus de 12 000 substances montre(nt) que les déclarants partagent les données, continuent d'utiliser des adaptations pour éviter les essais sur les animaux et ont davantage recours à des alternatives aux essais sur les animaux* ». Les déclarants ont utilisé au moins une méthode alternative pour éviter les essais sur les animaux pour près de 70 % des substances (ECHA, 2020).

Les méthodes alternatives développées depuis 50 ans

Ces méthodes ont largement bénéficié de l'avancée extraordinaire des connaissances en biologie cellulaire et moléculaire et en bio-informatique. En règle générale, elles n'ont pas été développées dans les laboratoires de recherche fondamentale à des fins de substitution à l'expérimentation animale. Elles répondaient à des préoccupations de compréhension du vivant et étaient considérées par les chercheurs comme les outils adéquats permettant de répondre à la question scientifique posée. Leur utilisation dans le cadre de la règle des 3R s'est principalement développée dans le domaine réglementaire, celui de l'évaluation des produits de santé, des phytosanitaires et des produits chimiques. Dans ce cadre, elles doivent être soumises à un parcours long et complexe de validation pour être acceptées par les autorités.

La culture cellulaire et les approches *in vitro*

Le développement de la culture cellulaire au 20^{ème} siècle a été largement utilisé dans le domaine des méthodes alternatives à visée substitutive. À partir des années 1980, l'Union Européenne a soutenu de nombreux programmes de recherche visant à développer des tests *in vitro* dans le domaine de la toxicologie réglementaire. Rappelons que la culture cellulaire est un ensemble de techniques biologiques utilisées pour maintenir des cellules vivantes hors de leur organisme ou de leur milieu d'origine afin de les employer dans un cadre expérimental. Ces techniques s'appliquent également au maintien *ex vivo* de tissus ou de fragments d'organes. En parvenant à maintenir un cœur de poulet isolé continuant à battre grâce à un liquide nutritif qu'il avait mis

au point (Carrel & Burrows, 1910), Alexis Carrel a été l'un des pionniers dans le développement de ces techniques au début du 20^{ème} siècle. Mais les premières cultures cellulaires n'ont été véritablement opérationnelles que plus tardivement. Ainsi, en 1952, Aron Moscona met au point une technique de dissociation des cellules d'un cœur embryonnaire de poulet en utilisant une enzyme, la trypsine. Et en cultivant ces cellules dissociées dans un milieu adapté, il constate qu'elles peuvent continuer à vivre tout en maintenant leurs capacités de contractions rythmiques (Moscona, 1952). Il a alors défini les conditions expérimentales qui devaient être réunies : un milieu de culture adapté contenant du sérum, la stérilité de ce milieu et une température de maintien des cultures à 37 °C. Cette technique, dite *in vitro* car les cellules étaient mises en culture dans des récipients en verre stérilisés pour éviter les proliférations bactériennes, a été fondamentale pour le développement ultérieur de la biologie cellulaire. Les premiers milieux de culture étaient généralement d'origine animale et contenaient du sérum de veau fœtal. Cependant, actuellement, on utilise surtout des milieux de culture synthétiques de composition définie et qui sont dépourvus de sérum. Ceci permet une meilleure reproductibilité des expériences et évite également le recours à l'animal pour le prélèvement du sérum.

Cependant, c'est au cours de la seconde moitié du 20^{ème} siècle qu'est intervenu un développement exponentiel des méthodes de cultures cellulaires et l'établissement de lignées cellulaires. Une lignée cellulaire provient de cellules isolées d'un organe, souvent d'origine cancéreuse, qui sont capables de proliférer et de se maintenir en culture indéfiniment par repiquage, on les dit alors « immortelles ». La première lignée établie, la lignée HeLa, a été obtenue à partir du cancer d'Henrietta Lack, mis en culture en 1951 par le biologiste G.O. Gey. Depuis, cette lignée est toujours utilisée dans les laboratoires, en particulier pour certains tests alternatifs en toxicologie cellulaire (Ambrose, 2017). Les très nombreuses lignées cellulaires développées depuis les années 1950 sont actuellement maintenues dans des collections dont la plus importante est l'*American Tissue Culture Collection* (ATCC), une société privée américaine sans but lucratif. Ce centre de ressources biologiques, créé dès 1914, est devenu le leader mondial dans la conservation de lignées cellulaires bien caractérisées avec une collection de plus de 4 000 lignées d'origine humaine, animale ou végétale. Ce sont les chercheurs les ayant développées qui les fournissent à l'ATCC afin de les conserver et de permettre leur utilisation par d'autres chercheurs. Chaque lignée est conservée dans l'azote liquide et possède sa carte d'identité avec toutes les indications permettant sa remise en culture dans le laboratoire qui souhaite l'utiliser. Les lignées d'origine humaine ont été particulièrement développées et utilisées ces dernières années. Certaines, comme la lignée HeLa, proviennent de cancers de diverses origines, d'autres ont été transformées à l'aide d'un gène d'immortalisation, souvent le gène T du virus SV40, ou bien mutées expérimentalement sur un gène de contrôle du cycle

cellulaire comme le gène de la protéine P53. Ces lignées sont des outils incontournables dans les laboratoires de biologie, qu'ils soient académiques ou industriels, et ont largement contribué au développement des méthodes alternatives de remplacement tout particulièrement en toxicologie (Clot & Marano, 2020)

Les biotechnologies au service des 3R

On peut actuellement cultiver presque tous les tissus, grâce à la mise au point de conditions de culture prévenant la dédifférenciation spontanée des cellules. Les hépatocytes, qui jouent un rôle central dans les mécanismes de métabolisation des xénobiotiques, ont été parmi les premières cellules dont on a cherché à maintenir l'état différencié *in vitro* à des fins de test alternatif. Les premières cultures d'hépatocytes adultes (Bissell *et al.*, 1973) avaient montré une faible durée de vie et de rapides changements phénotypiques, en particulier la disparition des fonctions différenciées, et un retour vers des caractéristiques fœtales. Ainsi, les enzymes de métabolisation des xénobiotiques qui sont fortement exprimées dans les hépatocytes adultes, telles que les cytochromes P450, s'effondrent après 48 heures. Grâce aux avancées des connaissances sur le rôle des facteurs de croissance, de la matrice extracellulaire et des interactions avec les autres cellules du foie telles que les cellules biliaires, des hépatocytes d'origine humaine peuvent actuellement maintenir leur différenciation en culture pendant plusieurs semaines et sont des outils devenus irremplaçables en pharmacologie et toxicologie (Godoy *et al.*, 2013). Le rôle du micro-environnement a pu être démontré, en particulier dans sa capacité de différencier des cellules souches embryonnaires ou somatiques vers n'importe quel phénotype. Ce micro-environnement cellulaire est constitué par une matrice extracellulaire, mise en place par les cellules et composée de macromolécules extracellulaires (protéines, glucides). Au sein des tissus, les cellules sont entourées par cette matrice plus ou moins hydratée. Lors du fonctionnement cellulaire, les signaux induits qui sont sécrétés et diffusent dans ce micro-environnement jouent un rôle important dans la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire.

La procédure la plus classique pour cultiver des cellules est la culture en 2 dimensions (2D) qui repose sur l'adhérence des cellules à une surface plane, par exemple une boîte de Pétri en verre ou en polystyrène pour fournir un support mécanique aux cellules. Cependant, cette approche ne permet pas de contrôler la morphologie cellulaire et conduit fréquemment à une dédifférenciation. Comme l'utilisation de matrices extracellulaires améliore les conditions physiologiques de culture cellulaire en contribuant à la différenciation ou au maintien de certaines caractéristiques fonctionnelles, actuellement les supports de culture sont en général recouverts d'une couche de matrice extracellulaire. Bien plus, il est possible d'améliorer ce système avec la méthode de culture en sandwich en plaçant les cellules entre deux couches de matrice extracellulaire, ce qui permet de maintenir la

morphologie et les fonctions bien mieux que la culture classique en 2D. Cette méthode appliquée aux hépatocytes favorise le maintien d'un taux significatif de production d'albumine pendant au moins 6 semaines, quand la culture sur une seule couche n'induisait que des taux dix fois inférieurs à la normale dès la fin de la première semaine (Suzuki *et al.*, 1993). En outre, alors que dans le système 2D à une seule couche la polarité des hépatocytes était affectée, la culture 3D en sandwich conduit à une distribution normale des marqueurs de la membrane plasmique. Une autre amélioration concerne la culture sur une membrane poreuse dans une chambre de culture à deux compartiments (Figure 1). Ce mode de culture permet de différencier l'environnement et le milieu des deux compartiments en se rapprochant des conditions *in vivo*. Il est particulièrement adapté à la culture des épithéliums respiratoires, intestinaux et cutanés (Baeza *et al.*, 2020). Dans ces conditions, les cellules se différencient, se polarisent et peuvent être gardées pendant une longue période. On peut également dans ce système réaliser des co-cultures afin de mimer les interactions biologiques (Figure 1).

Cependant, même si l'évolution des systèmes de culture classiques a permis d'améliorer le maintien *in vitro* de l'état différencié, on est encore loin de la complexité du tissu et de l'organe et des interactions dans l'organisme. La culture cellulaire en 3D vise à modéliser les interactions *in vivo* des tissus afin de favoriser la prolifération, la migration, la production de matrice et la différenciation des cellules souches. C'est dans ce sens que s'oriente actuellement le développement des nouvelles méthodes alternatives. L'environnement apte à la culture des cellules en 3D diffère selon le tissu concerné et divers systèmes ont été développés afin de créer des conditions se rapprochant du micro-environnement rencontré *in vivo* pour le développement cellulaire. Ils peuvent être basés sur des supports différents : des éponges (à base de polymères ou de protéines de la matrice extracellulaire), des hydrogels (synthétiques ou naturels) ou encore des supports plastiques (inserts ou films micro-structurés) (Baeza *et al.*, 2020). La culture cellulaire en 3D a joué un rôle essentiel dans les derniers développements des modèles cellulaires utilisés en alternative à l'expérimentation animale. Les sphéroïdes issus de ces recherches en sont les exemples les plus marquants. Ce sont des agrégats de cellules qui adhèrent entre elles par l'intermédiaire de la matrice extracellulaire et qui établissent des connexions intercellulaires. Une interaction dynamique cellule-cellule et cellule-matrice se met en place qui mime *in vitro* le micro-environnement des tissus *in vivo*. Les sphéroïdes proviennent de cellules tumorales ou bien de cellules primaires. Pour maintenir en continu ces interactions et conserver la structure des sphéroïdes on utilise des conditions de culture en hydrogel (collagène, Matrigel, acide hyaluronique...) ou en suspension (en bioréacteur). Il faut également un apport continu en oxygène et en facteurs de croissance durant la culture. À cet égard, le développement spectaculaire des techniques de microfluidique permet même la culture de sphéroïdes sur puce (Moshksayan *et al.*, 2018).

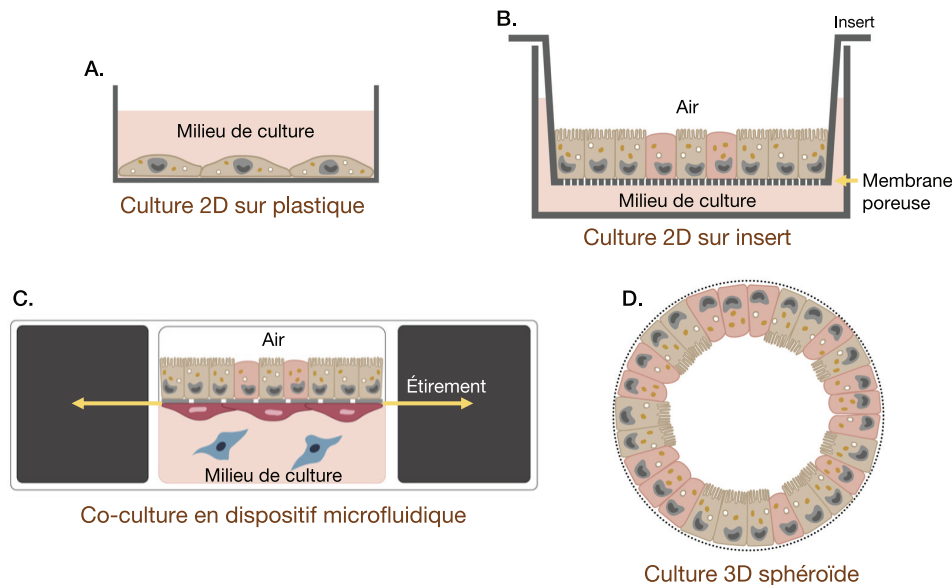


Figure 1. Illustrations montrant les différents modes de culture possibles en prenant l'exemple de l'épithélium bronchique. A. Cultures 2D sur matrice plastique, les cellules étant recouvertes du milieu de culture. B. Culture 2D en chambre à 2 compartiments : les cellules poussent sur une membrane poreuse, ce qui leur permet d'être nourries par le milieu de culture basal ; au niveau apical, les cellules sont au contact avec l'air pour mimer la situation existant *in vivo*. Dans ces conditions de culture, les cellules se polarisent et se différencient en cellules ciliées et en cellules sécrétrices de mucus. C. Co-culture en dispositif microfluidique : les cellules bronchiques sont cultivées sur un support poreux et au contact avec un flux d'air ; sur l'autre face du support poreux sont cultivées des cellules endothéliales et le flux de milieu de culture mime la circulation sanguine dans laquelle peuvent être placées des cellules du système immunitaire. Afin de mimer les mouvements se produisant lors de la respiration, des modifications de pression dans les compartiments latéraux (noirs) provoquent un étirement périodique du support poreux. D. Culture en sphéroïde (Baeza *et al.*, 2020, p. 101).

Les développements les plus récents et les plus prometteurs concernent les organoïdes obtenus à partir de cellules pluripotentes (cellules souches embryonnaires ou cellules souches somatiques pluripotentes) et maintenus dans des conditions de culture similaires à celles des sphéroïdes. Ce sont des structures tridimensionnelles constituées par des types cellulaires spécifiques d'un organe, issus de cellules souches et capables d'auto-organisation *in vitro* par différenciation et adhésion cellulaire de manière comparable à ce qu'on observe *in vivo* (Sasai *et al.*, 2012). Un organoïde est censé reproduire une ou plusieurs fonctions de l'organe ainsi que son organisation et sa morphologie. Il a fallu près d'un siècle pour passer des premiers fragments d'organes isolés qui perdaient rapidement leurs fonctions d'origine aux modèles actuels de peau reconstruite, de barrières alvéolo-capillaire, rénale, hémato-encéphalique ou de réseaux neuronaux en culture. Au-delà de ces organoïdes, les tumeurôides dérivés de tissus cancéreux qui contiennent des cellules tumorales et des cellules du micro-environnement tumoral commencent à être utilisés pour l'évaluation et le développement de traitements anticancéreux personnalisés.

Ces cellules, tissus et organes en culture permettent de répondre partiellement aux critiques traditionnelles des limites des cultures de cellules : manque de représentativité de l'organisation complexe de l'organe et encore plus de l'organisme. On les associe souvent à l'étude de l'expression d'un ou de plusieurs gènes normaux ou

transfectés. L'imagerie cellulaire actuelle rend possible la visualisation en 3D de leur expression, permettant ainsi d'étudier la physiologie normale ou pathologique d'un organe *in vitro*. Les applications en sont très larges : tests « alternatifs » en toxicologie, étude de l'efficacité d'agents thérapeutiques (nouveaux agents ou médecine personnalisée), compréhension de mécanismes pathologiques, identification de marqueurs qui seront utilisables pour le diagnostic, la médecine prédictive, les études épidémiologiques, et enfin la thérapie fonctionnelle (Artegiani & Clevers, 2018).

La validation des méthodes alternatives *in vitro* pour la réglementation et les approches *in silico*

Pour pouvoir utiliser une méthode alternative dans le domaine réglementaire de l'évaluation des substances chimiques, produits de santé, pesticides, elle doit être validée. Il s'agit alors d'une méthode d'essai qui doit être fiable, reproductible dans le temps au sein d'un même laboratoire et entre laboratoires, lorsqu'elle est exécutée en utilisant le même protocole. La méthode doit être pertinente, c'est-à-dire permettre de prédire correctement l'effet biologique recherché. Les critères de validation des nouvelles méthodes d'essai toxicologique utilisées aujourd'hui sont principalement définis par trois organisations : l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), le Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM), et le

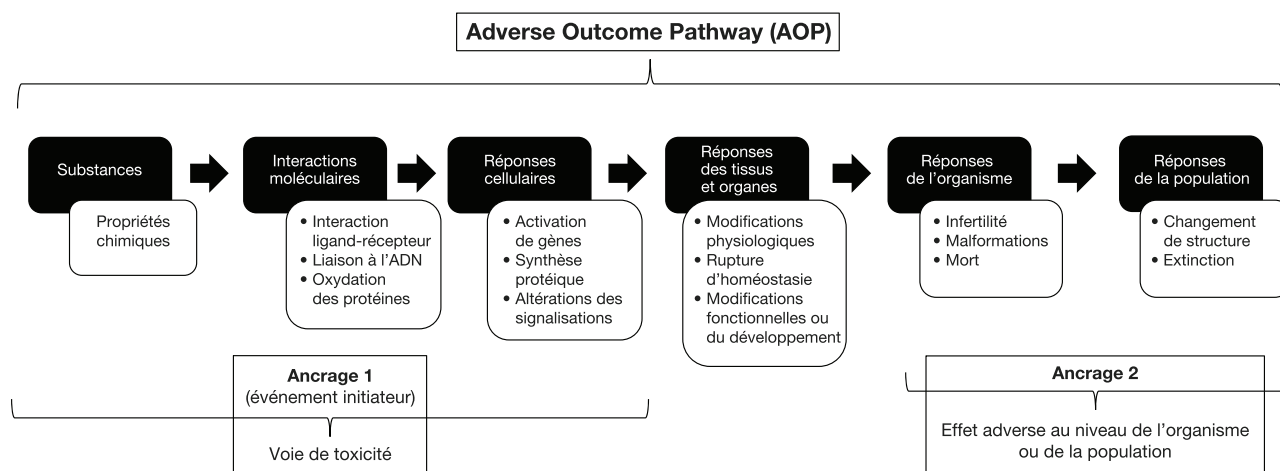


Figure 2. Diagramme conceptuel des principales caractéristiques d'une voie d'issue défavorable (AOP). Chaque AOP commence par un événement d'initiation moléculaire dans lequel un produit chimique interagit avec une cible biologique menant à une série séquentielle d'effets pour produire un résultat indésirable (Baeza *et al.*, 2020, p. 106).

Comité de coordination inter-agences sur la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) mis en place par l'Institut américain des sciences de la santé environnementale (NIEHS). Ces organismes, parfois appelés autorités de validation, travaillent à harmoniser leurs critères spécifiques au fil du temps et produisent des guides pour la validation des méthodes *in vivo* et/ou *in vitro* et/ou *in silico* dédiées à l'évaluation des substances. L'OCDE, l'ECVAM et l'ICCVAM fournissent également des orientations sur les questions de contrôle de la qualité relatives à la réalisation d'études de validation inter-laboratoires, comme les bonnes pratiques de laboratoire ou les bonnes pratiques de culture cellulaire (Boudet, 2020).

La validation d'un test *in vitro* est un processus particulièrement long, de sorte qu'il existe actuellement peu de tests validés d'un point de vue réglementaire. Ils concernent essentiellement le domaine de la cosmétologie où l'utilisation des animaux est interdite depuis 2009 en Europe pour les ingrédients comme pour les produits finis. Les tests disponibles permettent d'évaluer des paramètres de toxicité spécifiques comme l'absorption dermique, la phototoxicité, la corrosion et l'irritation cutanée et oculaire, la sensibilisation cutanée et la génotoxicité. Ils ont fait la preuve de leur efficacité pour détecter des risques sanitaires sans avoir à réaliser des tests supplémentaires chez l'animal.

Cependant tout un pan de l'évaluation de la toxicité n'est pas couvert par ces tests, en particulier la toxicité systémique et la toxicité chronique. C'est la raison pour laquelle une stratégie se développe actuellement pour prendre en compte le mode d'action des xénobiotiques dans le processus d'évaluation des risques. Il s'agit de la démarche AOP (acronyme de *Adverse Outcome Pathway*). Une AOP est une construction conceptuelle qui prend en compte les connaissances existantes entre un événement moléculaire primaire, par exemple la liaison entre un xénobiotique et une molécule biologique, et la cascade d'événements qui en résulte jusqu'à l'effet adverse

final (Figure 2). Dans cette démarche, il est important de déterminer à la fois l'étape initiale, qui peut être par exemple la liaison covalente avec une protéine ou la fixation sur un récepteur, et l'effet adverse qui se situe au niveau d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme. Les étapes clés doivent être reliées entre elles de façon plausible afin d'établir une chaîne de causalité entre l'événement moléculaire initial et l'effet adverse final. Cette chaîne peut intégrer des données allant des interactions moléculaires jusqu'à l'organisme, voire la population.

L'approche AOP est développée spécifiquement comme un des outils d'aide à la décision dans le domaine réglementaire afin d'intégrer les nouvelles données, en particulier celles qui sont fournies par le *screening* haut débit, les données d'exposition, les données humaines et celles qui proviennent des méthodes alternatives. L'exploitation de toutes ces données a nécessité le recours à la bio-informatique et le développement des méthodes de prédiction *in silico* a joué un rôle considérable dans la réduction de l'utilisation des animaux en pharmacologie et en toxicologie. Les méthodes *in silico* désignent des modèles bio-informatiques utilisant des bases de données provenant des expérimentations *in vivo* et *in vitro*. L'évolution technologique spectaculaire des ordinateurs a permis de pouvoir appliquer, avec une rapidité de plus en plus grande, des algorithmes de simulation numérique dans le domaine des sciences du vivant. Les méthodes *in silico* nécessitent des données initiales de qualité, à la fois fiables et bien éprouvées, pour construire les modèles les plus pertinents. Elles permettent alors de prévoir des mécanismes de toxicité *in vivo* et d'établir la pharmac- et la toxico-cinétique d'une molécule, d'un nouveau médicament ou d'un polluant de l'environnement. Ces approches computationnelles permettent de prédire de façon quantitative ou qualitative le comportement de systèmes biologiques complexes tout en provoquant un transfert d'informations entre expérimentations réelles et expérimentations simulées. En réalisant la simulation d'expéri-

mentations, ces approches contribuent à promouvoir les méthodes alternatives et à diminuer l'utilisation des animaux en recherche.

Un exemple d'approche *in silico* basé sur la modélisation de structures chimiques réside dans la caractérisation de la relation entre structure chimique et effets biologiques. Elle est connue sous le nom de modélisation QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*). Les modèles QSAR permettent de prédire le danger des substances chimiques à partir d'une base de données toxicologiques. D'ores et déjà, la modélisation QSAR a démontré son intérêt pour réduire de façon significative l'expérimentation animale (Mombelli *et al.*, 2020).

Conclusion

Le concept 3R a joué un rôle fondamental dans la prise de conscience de la nécessité d'un accompagnement éthique rigoureux de l'expérimentation animale. La réduction de l'utilisation des animaux et la nécessaire intégration de leur bien-être dans la démarche expérimentale sont devenues obligatoires dans les protocoles présentés aux comités d'éthique. Parallèlement, ce concept a également favorisé le développement des outils de la culture cellulaire et des approches de modélisation *in silico*. De nombreuses méthodes ont été mises au point et validées en application de la démarche de substitution. En permettant de se rapprocher *in vitro* du fonctionnement d'un organe *in vivo*, les derniers développements des recherches en biotechnologie, notamment la mise au point des organoïdes, sont particulièrement prometteurs. Leurs nombreuses applications démontrent qu'ils font partie des outils alternatifs les plus crédibles actuellement à l'expérimentation animale. Cependant, même si les approches *in silico* permettent de modéliser des fonctions physiologiques au sein d'un organisme, l'utilisation simultanée de toutes les approches demeure à l'évidence la meilleure façon de faire progresser les connaissances du fonctionnement du vivant dans le respect du bien-être animal.

Références

- Ambrose, C.T. (2017). The tissue culture laboratory of Dr. George Otto Gey 60 yrs ago as recalled by a former student. *In vitro Cell Dev Biol Anim*, 53, 467-473.
- Artegiani, B., Clevers, H. (2018). Use and application of 3D-organoid technology. *Hum Mol Genet*, 27, 99-107.
- Baeza, A., Kerdine-Römer, S., Yates, F. (2020). Méthodes alternatives *in vitro*, in: *Quelles alternatives en expérimentation animale ? Pratiques et éthique*, éd. Quae, pp. 95-112.
- Bernard, C. (1865). *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*. Baillière, Paris, pp. 177-178. <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/btv1b86120273/>.
- Bissell, D.M., Hammaker, L.E., Mayer, U.A. (1973). Parenchymal cells from rat liver in non-proliferating monolayer culture. Functional studies. *J Cell Biol*, 59, 722-734.
- Boudet, C. (2020). Définir et évaluer une méthode expérimentale crédible, in: *Quelles alternatives en expérimentation animale ? Pratiques et éthique*, éd. Quae, pp. 43-55.
- Carrel, A., Burrows, M.T. (1910). Cultivation of adult tissues and organs outside of the body. *J Am Med Assoc*, 55, 1379-1381.
- Clot, J.P., Marano, F. (2020). L'émergence du concept 3R et des méthodes alternatives, in: *Quelles alternatives en expérimentation animale ? Pratiques et éthique*, éd. Quae, pp. 13-25.
- Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Journal officiel de l'Union européenne, L 276/33, 20 octobre 2010
- ECHA. (2020). *Le recours à des alternatives aux essais sur les animaux au titre du règlement REACH*. https://echa.europa.eu/documents/10162/13639/alternatives_test_animals_2020_summary_fr.pdf.
- Godoy, P., Hewitt, N.J., Albrecht, U. *et al.* (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol*, 87, 1315-1530. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1078-5>.
- Maurin-Blanchet, H. (2007). L'expérimentation animale au cours du temps : un beau sujet de controverse. *Bull Soc Fr Hist Méd Sci Vét*, 7, 50-60.
- Mombelli, E., Vignon-Clementel, I., Drasdo, D. (2020). Méthodes *in silico* et modélisation des mécanismes de toxicité, in: *Quelles alternatives en expérimentation animale ? Pratiques et éthique*, éd. Quae, pp. 113-126.
- Moscona, A. (1952). Cell suspension from organ rudiments of chick embryos. *Exp Cell Res*, 3, 535-539.
- Moshksayan, K., Kashaninejad, N., Ebrahimi Warkiani, M., Lock, J.G., Moghadas, H., Firoozabadi, B., Said Saidi, M., Nguyen, N. T. (2018). Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture sensors and actuators. *Chemical*, 263, 151-176.
- Russell, W., Burch, R. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen Ed., London. https://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc.
- Sasai, Y., Eiraku, M., Suga, H. (2012). *In vitro* organogenesis in three dimensions: Self-organising stem cells. *Development*, 139, 4111-4121.
- Smyth, D. (1978). *Alternative to animal experiments*. Scholar Press, London (UK). 216 p.
- Suzuki, M., Ichikawa, K., Sakoda, A., Sakai, Y. (1993). Long-term culture of primary rat hepatocytes with high albumin secretion using membrane-supported collagen sandwich. *Cytotechnol*, 11, 213-218.