

Expérimentation animale

La lente progression des méthodes alternatives

Objectif affiché de la directive européenne de 2010, le remplacement des tests scientifiques sur animaux par des méthodes alternatives tarde à se concrétiser. Les projets innovants, pourtant, ne manquent pas, à la différence des moyens dédiés et d'une volonté politique forte.

L'intelligence artificielle n'en finit plus de déployer l'éventail de ses applications potentielles.

L'une des dernières en date : l'évaluation toxicologique. L'équipe de Thomas Hartung, professeur au Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health (Baltimore) où il dirige le Centre pour les alternatives aux tests animaux, a publié en juillet dernier un nouveau modèle de prédiction des effets toxicologiques de molécules chimiques, fondé sur le "machine learning"¹. Selon les auteurs, ce modèle baptisé RASAR (relations structure-activité par lecture croisée) a démontré une sensibilité et une spécificité comparables, voire supérieures, aux tests sur animaux décrits dans les lignes directrices de l'OCDE. Cette démonstration a été réalisée pour neuf types de tests de sécurité parmi les plus fréquemment utilisés en Europe et fortement consommateurs d'animaux. L'algorithme a été mis au point à partir d'une très large base de données provenant de l'European Chemical Agency, qui collecte les informations de toxicité des composés chimiques commercialisés dans l'UE.

Cette approche inédite vient s'ajouter à la longue liste de méthodes visant à se substituer aux tests sur animaux, déjà intégrées en routine pour certaines d'entre elles, encore en développement ou en phase de validation pour la plupart. Le "remplacement" est, avec la "réduction" et le "raffinement", l'un des piliers de la philosophie 3R, au cœur de



Le Pr Thomas Hartung, directeur du Centre pour les alternatives aux tests animaux du Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, a mis au point un algorithme pour prédire la toxicité des molécules chimiques.

la directive européenne du 22 septembre 2010 (2010/63/UE). Entrée en vigueur en 2013, elle fixe comme objectif « le remplacement total des procédures appliquées à des animaux vivants à des fins scientifiques et éducatives, dès que ce sera possible sur un plan scientifique ». Et pour y parvenir, elle stipule qu'une procédure impliquant l'animal ne peut pas être menée si on peut arriver au même résultat avec une autre procédure reconnue par l'UE et ne nécessitant pas d'animal.

Des études de sécurité très réglementées

Reste que, dans le champ du médicament, les tests d'efficacité (pharmacologie) et de sécurité (toxicité, pharmacocinétique et métabolisme)

relèvent d'un impératif réglementaire. Plusieurs d'entre eux recourent depuis longtemps à des méthodes in vitro, comme le test d'Ames (test de mutagenèse réalisé sur culture bactérienne). Mais pour de nombreux autres aspects, il n'existe pas encore de méthodes non animales validées par les régulateurs, à même de remplacer les tests sur animaux actuellement inscrits dans la Pharmacopée. « A ce jour, l'entrée des médicaments en phase clinique est encore conditionnée par l'obtention de résultats sur des modèles animaux », rappelle Thomas Borel, directeur des affaires scientifiques du Leem.

Quoique lentes, les avancées sont pourtant nombreuses en toxicologie. « Même si les tests in vitro sont encore minoritaires par rapport aux tests in

vivo dans notre catalogue, leur part augmente, assure Jean-François Le Bigot, président du groupe français Citoxlab, quatrième CRO mondiale. Dès que de nouveaux tests in vitro pertinents apparaissent, nous les intégrons à notre offre. » Le groupe a par exemple mis en place il y a deux ans, sur son site de Montréal, un test d'évaluation de la cardiotoxicité sur lignée cellulaire, intégré dans les guidelines de la FDA. Et reste à l'affût de toutes les avancées qui se font, partout dans le monde, « à bas bruit ». Il y a quelques années, le groupe a investi dans une petite société américaine, Stemina, qui utilise des cellules souches humaines pour évaluer le potentiel tératogène des candidats médicaments, un modèle qui est maintenant en cours de validation. Depuis plus d'un an, il collabore avec le strasbourgeois KaLy-Cell dans l'évaluation in vitro de l'hépatotoxicité et du métabolisme. En mars dernier, Citoxlab a acquis le hongrois Solvo, leader dans l'étude in vitro du transport et des interactions médicamenteuses. Et début septembre, il a investi dans la société berlinoise EPO qui évalue l'efficacité des médicaments anticancéreux, grâce à des outils de criblage sur tumeurs humaines. Lorsque de nouvelles problématiques émergent, des tests in vitro peuvent être spécifiquement conçus pour y répondre. « Il y a vingt ans, on ne se posait pas la question d'un effet "per-

turbateur endocrinien", témoigne Philippe Hubert, directeur des risques chroniques de l'Ineris (Institut national de l'environnement industriel et des risques) et directeur du Francopa². Aujourd'hui cet effet s'évalue plutôt in vitro, trop souvent sur des récepteurs isolés. » D'importants progrès ont aussi été réalisés ces dernières années dans le développement de méthodes in vitro fondées sur les cellules iPS (cellules souches pluripotentes induites) pour des tests de toxicité.

Des marges de manœuvre sur le contrôle qualité

En aval du développement, les tests de contrôle qualité des lots de médicaments et de vaccins avant leur commercialisation sont aussi très consommateurs d'animaux. « En immunologie, on ne sait pas encore reproduire les effets des vaccins en dehors de l'animal entier, il s'agit de mécanismes trop complexes, explique Jean-Christophe Audonnet, vétérinaire et président du comité d'éthique chez Boehringer Ingelheim santé animale. Dans ces domaines, beaucoup de tests sur animaux sont imposés par la Pharmacopée et sont difficiles à remplacer. Mais l'objectif est de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés : dans le champ du contrôle qualité, la marge de progrès est énorme. » C'est dans cette optique que les équipes de Merial, aujourd'hui intégrées au sein

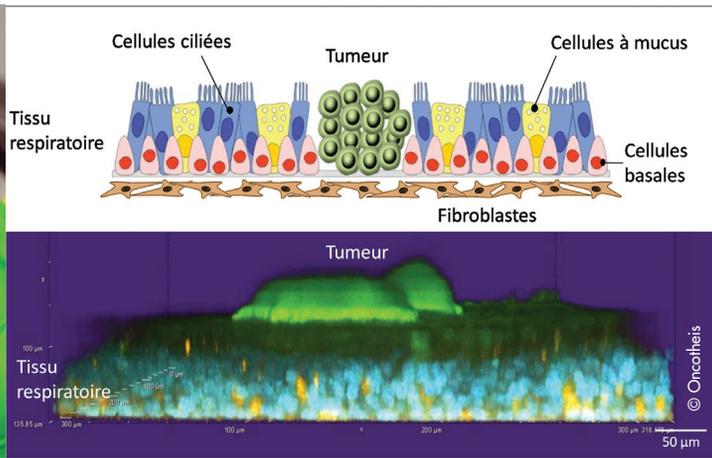
de Boehringer Ingelheim, ont mis au point une méthode in vitro (test ELISA), permettant de remplacer les tests d'activités biologiques (sur animaux) requis pour le contrôle de leur vaccin antirabique à usage animal³. « C'est une très belle avancée, se réjouit Corinne Philippe-Reversat, vétérinaire et directrice des affaires publiques et de la communication réglementaire de Boehringer Ingelheim santé animale. Mais ce test n'est pas généralisable tel quel à d'autres vaccins antirabiques, les procédés de fabrication et les adjuvants utilisés étant différents. Pour autant, nos travaux proposent une méthodologie dont d'autres fabricants pourront s'inspirer. »

D'autres substances que les vaccins sont soumis à des évaluations de stabilité et d'activité, comme la toxine botulique de type A, principe actif du Dysport[®] d'Ipsen. Alors que ces examens se font pour l'instant sur animaux, le laboratoire français a annoncé fin juillet l'approbation par les autorités européennes et suisses du test cellulaire qu'il a développé. De son côté, Sanofi a vu l'une de ses équipes allemandes récompensée en 2016 par le Hesse Animal Protection Prize, pour la mise au point d'un test in vitro de mesure de l'activation des récepteurs à l'insuline humaine. Selon le laboratoire, celui-ci a totalement remplacé depuis deux ans le test in vivo pour le contrôle des lots d'insuline libérés sur son site de Francfort.

D'un pays à l'autre, un affichage politique variable

« Zéro expérimentation animale d'ici à 2025 » : telle était l'ambition proclamée début 2017 par le ministre de l'Agriculture néerlandais, Martijn van Dam. Cette annonce faisait suite à la publication, en décembre 2016, d'un rapport du Comité national néerlandais pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (NCad), selon lequel il était « possible » à cette échéance de se passer de tous les tests de sécurité sur animaux pour les produits chimiques, les ingrédients alimentaires, les pesticides et les médicaments vétérinaires, ainsi que des tests de contrôle avant libération des produits biologiques comme les vaccins. A la suite de cette annonce, une plate-forme multi-parties prenantes a été constituée et a défini un Programme de transition pour l'innovation sans utilisation d'animaux (TPI), présenté par le ministre au Parlement néerlandais en juin dernier. « Cette transition va bien au-delà de la politique des 3R. L'idée est que la science moderne peut réellement faire mieux que les tests sur animaux actuels, souligne Anke Sikkema, en charge de la gestion du TPI au ministère de l'Agriculture néerlandais. Mais il n'est nullement dans nos intentions d'interdire les tests sur animaux en absence de méthode alternative. L'objectif du TPI est de stimuler et d'accélérer cette transition, et cela vaut également pour la recherche pharmaceutique. Nous pensons qu'un jour, les innovations réalisées sans recours à l'animal deviendront la norme. »

En France, pas de déclaration aussi tonitruante de nos gouvernants. Mais la question s'est tout de même invitée lors du dernier CSIS. Parmi les 45 mesures retenues, l'une propose de « développer une plate-forme d'informations et d'échanges » en vue de poursuivre la promotion des 3R, en lien avec l'ensemble des parties prenantes, en particulier sur les enjeux de formation, de transparence et d'homogénéisation. Une mention « d'une haute portée » selon Thomas Borel (Leem), qui précise que « des annonces » sont attendues prochainement sur le sujet.



L'impression 3D au service de la modélisation de tissus. A gauche, le modèle de peau humaine complète Poieskin® du bordelais Poietis ; à droite, le modèle de cancer du poumon humain OncoCilAir™ du suisse Oncotheis. Deux modèles in vitro de grand intérêt pour la recherche pharmaceutique, mais qui, faute de validation, ne peuvent pour l'instant remplacer les tests réglementaires sur animaux.

Pour autant, selon Philippe Hubert, les « vrais » remplacements sont rares, tant dans le champ des études précliniques de sécurité que dans le contrôle qualité. « La tendance va plutôt vers la réduction du nombre d'animaux, ou la dispense de certains tests qui ne sont plus jugés utiles ou pertinents », note-t-il. Par exemple, à compter du 1^{er} janvier 2019, l'essai de « toxicité anormale », conçu à l'origine pour détecter la présence de contaminants externes dans les produits biologiques (et réalisé sur des animaux), disparaîtra totalement de la Pharmacopée : les normes de bonnes pratiques de fabrication sont aujourd'hui considérées comme une garantie de sécurité suffisante.

De nouveaux outils pour la recherche

Les tests à des fins de sécurité sanitaire ne sont pourtant pas les plus consommateurs d'animaux. Ainsi en France, la recherche fondamentale arrive en tête avec 43 % des animaux utilisés à des fins scientifiques dans les établissements français. Elle devance les recherches translationnelles ou appliquées (26 %) et la mise au point, la production ou les essais de qualité, d'efficacité et d'innocuité de médicaments, d'aliments et autres substances (25 %) (données 2016 du ministère de la Recherche). Mais là encore, des méthodes émergent, faisant appel aux technologies les plus innovantes. La société bordelaise Poietis a ainsi mis au point un procédé de bio-impression 4D utilisant la technologie laser pour créer

des modèles tissulaires complexes in vitro. Après avoir lancé en début d'année un modèle de peau humaine complète, Poieskin®, l'entreprise a conclu en septembre 2018 un partenariat scientifique pluriannuel avec Servier autour d'un modèle de tissu hépatique complexe. Objectif : étudier in vitro les phénomènes de réponse inflammatoire afin d'améliorer la détection précoce du potentiel hépatotoxique de candidats médicaments. « Il y a une vraie demande de modèles in vitro pour les études de sécurité et de toxicologie, observe Bruno Brisson, directeur général de Poietis. Servier n'est pas la première société pharmaceutique avec laquelle nous avons conclu un accord de co-développement dans le but de mieux cribler de nouvelles molécules, et nous avons aussi des collaborations avec des acteurs académiques. » Mais l'ambition de la société porte davantage sur des applications de sa technologie en thérapie cellulaire.

De son côté, la société suisse Oncotheis a développé un modèle 3D in vitro de cancer du poumon humain, OncoCilAir™. Il comprend à la fois des cellules saines de l'épithélium pulmonaire et des nodules tumoraux. « Cette double composante nous permet donc de tester sur le même microtissu la spécificité de ciblage d'une nouvelle thérapie, son efficacité contre la progression des tumeurs et sa toxicité sur les différentes cellules saines composant l'épithélium respiratoire », explique Christophe Mas, directeur scientifique d'Oncotheis. Distribué depuis

2015, OncoCilAir™ est déjà utilisé par des industriels pour tester l'efficacité et la toxicité de leurs composés, de la petite molécule aux anticorps, et même des virus oncolytiques. Mais le processus de validation auprès des régulateurs n'est pas encore engagé.

Absence de modèle économique

Les industriels ont tout intérêt à disposer de méthodes plus adaptables, reproductibles et plus facilement manipulables que celles utilisant des animaux. L'EFPIA rappelle d'ailleurs son engagement dans le programme européen IMI, qui a soutenu de nombreux projets dans le champ des 3R. Selon l'association industrielle, ces projets ont notamment abouti en dix ans à la mise au point de 34 outils et modèles in vitro et de 316 modèles in silico. Pour l'instant l'objectif est moins de remplacer les tests sur animaux que de réduire le nombre de tests nécessaires et le nombre d'animaux utilisés par test. Car pour passer de la réduction au remplacement, la validation des méthodes alternatives et leur inscription dans les lignes directrices internationales demeurent des prérequis incontournables. C'est pour répondre aux besoins croissants de développement et de validation de méthodes alternatives que l'ECVAM, lancé en 1991, est devenu en 2011 le laboratoire de référence de l'Union européenne pour les alternatives aux tests sur animaux (EURL-ECVAM). Ses attributions ont été étendues, au-delà de l'utilisation « réglemen-

taire” des animaux, à l’ensemble des aires requérant leur usage à des fins scientifiques. Le renforcement de la structure (dotée d’un budget annuel d’environ 6 M€) devait conduire à une accélération de l’adoption des méthodes alternatives par l’OCDE et la Pharmacopée européenne. Selon un porte-parole de l’EURL-ECVAM, « l’UE a financé le développement de méthodes de recherche et de tests sans animaux pour plus de 400 M€, répartis sur plus d’une centaine de projets, sur la période 2006-2016 ». Mais pour Philippe Hubert, « le modèle économique est bien le maillon faible du système. Le financement se limite au développement et ignore l’étape essentielle qu’est la validation ». « Voir notre modèle OncoCilAir™ validé serait une très belle avancée, mais les coûts étant à la charge du développeur, une petite PME comme la nôtre n’a pour l’instant pas les moyens de s’engager seule dans cette démarche », commente Christophe Mas. Quant au modèle de tissu hépatique de Poietis, il devrait en théorie pouvoir permettre de s’affranchir en partie de certains tests sur animaux. Mais même si son développement bénéficie désormais de l’appui d’un industriel, sa validation comme base d’une méthode alternative pour les tests d’hépatotoxicité « n’est pour l’instant pas inscrite dans notre contrat avec Servier », indique Bruno Buisson.

En l’état, la directive européenne n’exige pas que les pays membres s’engagent dans le développement et la validation de ces nouvelles approches. Et selon un porte-parole de l’ECVAM, aucun amendement n’est prévu à court terme. Mais pour Muriel Obriet, membre de la Com-

mission condition animale d’Europe Ecologie-Les Verts, des modifications s’imposent pour tenir compte des progrès accomplis depuis huit ans dans la mise au point de méthodes alternatives. « Malgré ces développements, le nombre d’animaux utilisés à des fins scientifiques n’a pas diminué depuis 2010, c’est bien qu’il y a un problème ! déplore-t-elle. Dans la plupart des Etats membres il n’y a ni la volonté ni les moyens mis en œuvre pour que l’on puisse réellement avancer sur ce sujet. Si l’objectif à terme est réellement “le remplacement total”, il va bien falloir fixer des étapes, des jalons, et se donner les moyens de le s’atteindre. » « Il faudrait, au moins, construire les moyens du développement et de la validation des méthodes non animales, y compris sur le plan financier », ajoute Philippe Hubert.

Un objectif de très long terme

Tout en affichant leur engagement, les industriels ne croient pas à la disparition totale des tests sur animaux. « Peut-être qu’à très long terme, on éliminera la plus grande part du recours à l’animal, mais à court ou moyen terme, certainement pas », affirme Thomas Borel. « Les pressions pour avoir des traitements toujours plus sûrs tendent à renforcer et à accroître les exigences de sécurité, souligne un porte-parole de l’EFP-PIA. Jusqu’à ce que la loi change ou que de nouvelles approches scientifiques émergent, l’animal continuera d’être nécessaire. » « De même que les médicaments à usage humain devront toujours être in fine testés sur l’homme, les médicaments vétérinaires devront in fine être testés sur l’animal », observe pragmatique-

ment Thomas Hartung. Lui-même reconnaît les limites de son algorithme pour remplacer certains types de tests. « Les effets très complexes comme par exemple la cancérogénicité, une toxicité d’organe chronique ou pour l’embryon en développement, ne peuvent être élucidés par une approche aussi simple. Il est aussi très difficile d’envisager la prédiction des effets comportementaux. » Les substances plus complexes échappent aussi, pour l’instant, à ce type d’approche. « Contrairement à la quasi-totalité des molécules chimiques, dont la structure est connue, la plupart des produits biologiques sont des mélanges complexes qu’il est difficile d’identifier et de caractériser, explique un porte-parole de l’ECVAM. Dès lors, les exigences méthodologiques pour détecter la toxicité ou l’efficacité de ces produits peuvent différer d’un produit à un autre. Les développements dans ce domaine sont nombreux, mais il n’est pas encore possible de remplacer tous les tests sur animaux. » Pour Jean-François Le Bigot, il ne sert à rien d’opposer la « bonne recherche » sans animal à la « mauvaise recherche » nécessitant l’utilisation d’animaux. « La bonne approche, c’est d’utiliser la méthode la plus pertinente pour répondre à une question bien posée. » Pour lui, la mise en œuvre de 3R relève d’un continuum. « C’est par le raffinement que l’on réduit, et c’est par la réduction qu’on finit par arriver au remplacement. D’aucuns considèrent que cela avance trop lentement, mais je sais la complexité de ces questions : il faut donner les moyens aux scientifiques plutôt que leur mettre la pression. » ■

Julie Wierzbicki

Un sujet tabou

Parmi les grands laboratoires pharmaceutiques français sollicités, aucun n’a souhaité s’exprimer sur le développement des alternatives à l’expérimentation animale. Ce n’est pas faute d’un engagement concret de leur part, comme en témoignent les exemples décrits ci-contre. Mais tout ce qui touche à l’expérimentation animale est considéré comme hautement sensible. « Nous avons en France un vrai problème de pédagogie sur la recherche, avec un focus sur les aspects “risque” et «principe de précaution », explique Thomas Borel (Leem). « C’est un sujet à fleur de peau pour le grand public, personne ne veut s’exposer », justifie le porte-parole d’un laboratoire français. Une attitude préjudiciable à la crédibilité des discours prônant la transparence.

(1) T. Luechtefeld et al. (2018) *Toxicological Sciences* 165 (1).

(2) Lancée en 2007, la plate-forme Francopa a pour mission de promouvoir le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale, en créant un consensus entre les différentes parties prenantes : chercheurs, régulateurs, industriels et associations de protection des animaux.

(3) C. Sigoillot-Claude et al. (2015), *Vaccine* 33.