

# MÉTHODES SUBSTITUTIVES À L'EXPÉRIMENTATION ANIMALE : ASPECTS RÉGLEMENTAIRES, ÉTAT DE L'ART ET PERSPECTIVES

## ALTERNATIVE METHODS TO ANIMAL EXPERIMENTATION: REGULATORY ASPECTS, STATE OF THE ART, AND PROSPECTS

par Isabelle FABRE<sup>(1)</sup>  
(Communication présentée le 9 octobre 2008)

### RÉSUMÉ

Les méthodes substitutives à l'expérimentation animale s'inscrivent dans le principe des 3R (raffiner, réduire et remplacer), défini par Russell et Burch en 1959.

La réglementation européenne impose, dans sa directive cosmétique, l'interdiction de l'expérimentation animale dès 2009 pour les ingrédients. Le nouveau règlement REACH relatif à l'évaluation des substances chimiques propose la mise en œuvre de stratégies par étapes, afin de n'utiliser l'animal qu'en dernier recours. Des progrès notables ont été réalisés dans le domaine des médicaments biologiques et plus particulièrement dans celui des vaccins dont le contrôle de la qualité des lots impose la mise en œuvre de tests essentiellement réalisés chez les animaux. La Pharmacopée Européenne a ainsi publié ou modifié de nombreuses monographies proposant la suppression de méthodes désormais inutiles en raison de la mise en place des bonnes pratiques de laboratoire (BPL), des bonnes pratiques de fabrication (BPF) et de l'assurance qualité (AQ), par exemple dans l'étude de la toxicité anormale; elle propose de nouvelles méthodes *in vitro*, par exemple le test du Limulus (Limulus Amebocyte Lysate) en remplacement du test d'apyrogénicité chez le lapin ou des stratégies de réduction à la fois du nombre d'animaux utilisés et de la souffrance qui leur est infligée, comme les tests sérologiques à la place des tests de challenge.

Dans tous les cas, se pose la question de la validation des méthodes alternatives. En effet, une méthode qui doit remplacer une méthode réglementaire utilisant l'animal doit faire l'objet d'une validation scientifique et doit être approuvée par les instances réglementaires avant d'être utilisée.

Les nouveaux modèles biologiques ainsi que les outils d'analyse plus performants, physico-chimiques, exploratoires ou de criblage à haut débit couplé à la bioinformatique offrent des perspectives alternatives prometteuses. Enfin, une collaboration internationale entre les différents acteurs réglementaires, tels que l'International Conference of Harmonisation (ICH) et l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) et les différents secteurs industriels, est maintenant nécessaire, afin que les méthodes substitutives validées soient réellement appliquées.

**Mots-clés :** méthodes substitutives, expérimentation animale, validation, réglementation, contrôle qualité, principe des 3R.

(1) Unité de Biologie Cellulaire, AFSSAPS, 635 rue de la Garenne, 34740 Vendargues

**SUMMARY**

*Alternative methods to animal testing are included in the 3R principle (refine, reduce, replace) defined by Russell & Burch in 1959.*

*In the European Union, the 7<sup>th</sup> Amendment of the cosmetic directive introduces a ban of animal testing for final cosmetic products and a phase-out of any animal testing for ingredients, with deadlines of 2009 and 2013, respectively. The new REACH regulation on chemicals proposes integrated strategies that make maximum use of non-animal approaches, refined and updated animal testing being used only as a last resort. Marked progress has been made in the field of biological medicinal products, specifically in the area of vaccines, whose quality control procedures require mostly in vivo testing. The European Pharmacopoeia has published numerous monographs suggesting dropping methods now obsolete with the advent of the GMP, GLP and QA practices (e.g. in the study of abnormal toxicity). It suggests using new in vitro methods instead (e.g. BET instead of rabbit pyrogen test), or strategies aimed at reducing the number of animals tested and the suffering inflicted (e.g. serological titration instead of challenge test).*

*However, this raises the question of the validity of alternative methods. Before they can be used in replacement of animal methods, their scientific validity must be proven and they must be officially accepted by the regulatory agencies.*

*The development of new biological models and high performance analysis tools, such as physical and chemical assays, exploratory methods, or high-throughput screening combined with biocomputing, offers promising alternatives opportunities. Finally, an international collaboration between regulatory bodies (ICH, OECD) and the various industries is currently necessary to ensure that the validated alternative methods are effectively adopted.*

**Key words:** *alternative methods, animal experimentation, validation, regulation, quality control, 3R principle.*

**INTRODUCTION**

Au cours des deux dernières décennies, un fort courant européen, répondant à la demande du public et des préoccupations de nombreux chercheurs, a conduit à une réduction progressive de l'utilisation des animaux de laboratoire.

Ainsi, la directive européenne 86/609/CEE a été le point de départ de nombreuses initiatives qui ont permis le développement de nombreux modèles et méthodes substitutives à l'expérimentation animale, par exemple les modèles cellulaires tridimensionnels, ceux fondés sur la bioinformatique, les modèles mathématiques *in silico*. Dans ce contexte, la réglementation européenne appliquée aux produits cosmétiques a imposé l'interdiction de l'expérimentation animale déjà en vigueur pour les produits formulés, et la décision de cette interdiction est imminente pour l'évaluation de l'innocuité des ingrédients (2003/15/CEE). Les méthodes alternatives largement utilisées pour la recherche fondamentale et le développement dans le domaine de la biologie médicale, en particulier pendant la phase de recherche et de développement d'un nouveau médicament, ne peuvent être appliquées dans un contexte réglementaire qu'à la suite d'un long processus de validation apportant la preuve de leur équivalence avec

la méthode de référence réalisée chez l'animal. Ainsi, des méthodes substitutives ont été validées et adoptées dans les domaines de la corrosion cutanée, l'absorption cutanée, la photo-toxicité et le seront dans un futur proche pour évaluer l'irritation cutanée et oculaire des substances chimiques. De nombreux projets européens retenus dans le cadre des deux derniers programmes de recherche (5<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> PCRD) arrivant à leur terme, devraient aboutir à proposer des méthodes applicables aux substances chimiques concernées par le nouveau règlement européen REACH<sup>(2)</sup>, dans les domaines de la toxicité chronique hépatique et rénale, de la sensibilisation et de la toxicité aigüe.

Par ailleurs, le programme de standardisation biologique mis en place par l'EDQM<sup>(3)</sup> pour les produits biologiques, en partie dédié aux méthodes 3R, a permis de réduire considérablement l'utilisation et la souffrance des animaux utilisés pour le contrôle de la qualité des vaccins. Cette revue a pour objectif de faire le point sur les avancées, en termes de validation réglementaire, des méthodes substitutives à l'expérimentation animale et de présenter les perspectives d'évolution dans ce domaine.

(2) REACH pour enRégistrement, Evaluation et Autorisation des substances Chimiques: nouvelle réglementation européenne ayant pour but d'offrir une meilleure protection vis-à-vis des substances chimiques intentionnellement induites.

(3) European Directorate for the Quality of Medicines ou Direction Européenne de la Qualité du Médicament et soins de santé.

## LA RÉGLEMENTATION EUROPÉENNE SUR L'EXPÉRIMENTATION ANIMALE

La directive européenne 86/609/CEE régit le champ d'application de l'expérimentation animale dans l'Union européenne (UE) et s'applique aux animaux vertébrés utilisés dans des expérimentations susceptibles de produire de la douleur, de la souffrance, de la détresse ou des dommages durables. Elle incite à utiliser les méthodes 3R et s'applique à tous les domaines faisant appel à l'expérimentation animale, y compris en recherche fondamentale et dans les cursus de formation. Elle impose à chaque État membre de recueillir tous les trois ans des données précises sur le nombre et le type d'expérimentations réalisées chez des animaux, sur leur territoire. Le Cinquième rapport, publié en 2007, relève le nombre d'animaux utilisés, par les États membres de l'UE à des fins expérimentales et à d'autres fins scientifiques; il fait état de 12,1 millions d'animaux, dont environ 75 % de rongeurs, utilisés en 2005 par 25 pays européens. La biologie médicale est le secteur le plus consommateur avec 60 % d'animaux consacrés à la recherche et au développement et 15,3 % d'animaux utilisés pour le contrôle de la qualité des produits de santé.

## LES MÉTHODES SUBSTITUTIVES CONTRAINTES RÉGLEMENTAIRES

La plupart des secteurs industriels concernés sont soumis à des obligations réglementaires qui ne peuvent être respectées qu'en pratiquant des essais chez les animaux. Cependant les contraintes d'utilisation des méthodes dites alternatives sont différentes selon la nature des produits.

### Les produits cosmétiques

La directive européenne 76/748/CEE précise les exigences réglementaires relatives aux produits cosmétiques dans l'UE. Les tests requis pour les ingrédients cosmétiques sont destinés à évaluer leur toxicité aiguë, leur tolérance locale (irritation/corrosion cutanée et oculaire), leur potentiel sensibilisant au niveau cutané, leur absorption cutanée, leur toxicité lors d'applications répétées, leurs potentiels mutagène/génotoxique et carcinogène, leur repro-toxicité, leurs propriétés toxico-cinétiques, leurs effets photo-induits; sont également prises en compte les données chez l'homme, si celles-ci sont disponibles, comme cela est recommandé par le Comité scientifique des produits de consommation (SCCP).

Le 7<sup>e</sup> amendement de cette directive (2003/15/CEE) impose l'interdiction de l'utilisation de l'animal pour évaluer la sécurité des produits cosmétiques. Cette interdiction, déjà en vigueur pour les produits finis, sera appliquée dès 2009 pour les ingrédients. Un report en 2013 est accordé pour les études de toxicité à long terme (la toxicité par applications répétées, la repro-toxicité, la toxico-cinétique).

À ce jour, les industriels ne disposent de méthodes substitutives que dans les domaines de l'évaluation de la corrosion cutanée (OCDE TG 430, 431), de la photo-toxicité (OCDE TG 432), de l'absorption cutanée (OCDE 428) et bientôt pour l'irritation cutanée validée par l'ECVAM<sup>(4)</sup> et en cours d'étude à l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE).

### Les médicaments

Le secteur pharmaceutique est largement tributaire des essais chez les animaux pour évaluer l'efficacité des médicaments et leur toxicité, chez l'homme. L'expérimentation animale est présente dans la phase de recherche et dans la phase préclinique; cependant, les données obtenues chez l'animal peuvent être utilisées jusqu'à la phase de pharmacovigilance et notamment, au sein des plans de gestion de risques des médicaments, demandés aux laboratoires depuis 2004. Les études requises préalablement à une première administration chez l'homme sont de trois types: les études de pharmacologie qui établissent la validité du concept thérapeutique et son applicabilité chez l'homme et celles de toxicologie qui évaluent la sécurité d'utilisation du produit: ces études permettent d'établir le rapport bénéfice-risque et de prendre la décision de l'administration à l'homme. Enfin les études de pharmacocinétique et de métabolisme déterminent le devenir du médicament dans l'organisme des animaux et aident à choisir la première dose à administrer chez l'homme.

Tout médicament est un produit actif et, à ce titre, a un potentiel de toxicité, en fonction de la dose par exemple. Les tests de toxicologie permettent de caractériser la toxicité générale du produit, sa toxicité spécifique vis-à-vis des organes de la reproduction et du système immunitaire, ainsi que la cancérogénicité. Ils sont conduits chez l'animal, cependant les méthodes alternatives sont présentes à tous les niveaux du développement d'un médicament, particulièrement lorsqu'il s'agit de mettre en évidence les mécanismes d'action et d'orienter le choix de l'espèce non-rongeur qui sera requise pour les tests toxicologiques. Les études chez l'animal ont considérablement évolué: le passage aux Bonnes Pratiques de laboratoire (BPL) et l'harmonisation internationale des programmes de toxicologie (Programme ICH) ont permis d'éviter de reproduire des essais ou de conduire des essais inutiles, tout en assurant une meilleure validation et une meilleure reconnaissance internationale.

### Les médicaments immunologiques

La qualité, l'innocuité et l'efficacité des produits biologiques sont en priorité sous la responsabilité du fabricant mais il incombe à l'autorité sanitaire nationale d'établir les procédures destinées à garantir leur conformité aux normes établies. Dans le cas des produits immunologiques (vaccins, toxines, sérums), la matière première de départ du principe actif est celle d'un système biologique de nature complexe présentant une variabilité intrinsèque. La directive européenne 89/342/CEE prévoit des dis-

(4) European Centre for the Validation of Alternative Methods ou Centre Européen pour la Validation des Méthodes Alternatives.

Méthode substitutive	Remplacement de :	Produits concernés
Test de recherche d'endotoxines bactériennes (LAL) (2.6.14)	Test d'apyrogénicité chez le lapin (2.6.8)	- Vaccins humains - Produits sanguins - Produits biotechnologies - Antibiotiques - Radiopharmaceutiques
<b>Toxicité générale :</b> Suppression de tests inutiles si la preuve est apportée de la régularité de la production	Toxicité anormale chez la souris et le cobaye (2.6.9) Test de recherche de substances • Histaminiques (2.6.8) • Hypotensives (2.6.11)	- Vaccins humains - Produits sanguins - Produits biotechnologies - Antibiotiques
<b>Tests de sécurité :</b> Suppression de tests inutiles si la preuve est apportée de la régularité de production	Test de toxicité anormale chez la souris et le cobaye (Monographie générale 0062)	Vaccins vétérinaires
<b>Dosages physicochimiques (HPLC)</b>	Bio-essais chez la souris	Hormones
<b>Dosage de l'Antigène par ELISA dans le vaccin</b>	Tests sérologiques chez la souris	- Vaccins Hépatites A et B - Vaccin vétérinaire « New Castle Disease »

**Tableau 1 :** Bilan des méthodes substitutives réglementaires appliquées au contrôle de la qualité des vaccins (Monographies de la Pharmacopée Européenne 2007, Hendriksen 2007).

positions spécifiques pour cette catégorie de médicaments. La procédure exige qu'avant la mise sur le marché, des contrôles spécifiques soient pratiqués sur chaque lot de vaccin produit, afin d'en vérifier l'identité, l'activité, la sécurité microbiologique et la stabilité. Ces contrôles de la qualité sont réalisés à la fois par le fabricant et par un laboratoire national de contrôle, autorité qui délivrera le certificat de conformité permettant la mise sur le marché du lot. Le Contrôle Qualité des produits immunologiques, qui utilise environ 30 % des animaux nécessaires à l'élaboration d'un vaccin, est donc réalisé en double, par le fabricant et par le laboratoire de contrôle. Domaine à fort potentiel de réduction de l'expérimentation animale, il a été identifié comme axe prioritaire des travaux de l'ECVAM. En complémentarité avec l'ECVAM, l'EDQM a mis en place en 1994 un programme de standardisation biologique (BSP) dont l'un des axes de travail est le développement et la validation des méthodes 3R appliquées aux produits biologiques, afin de les intégrer dans la Pharmacopée Européenne (référentiel européen de méthodes appliquées au médicament) sous forme de monographies. Celles-ci sont identifiées par un code (**tableau 1**).

### Les produits chimiques

Le règlement REACH adopté par l'EU en décembre 2006 a pour objectif majeur de protéger la santé humaine et la qualité de l'environnement. Ce règlement s'applique aux nouvelles substances mais également aux molécules chimiques anciennes encore sur le marché, dont les risques n'ont pas été suffisamment évalués : 30 000 molécules sont concernées par ce nouveau règlement. REACH place sous la responsabilité des fabri-

cants et importateurs essentiellement le partage de leurs données afin de réduire les essais chez les animaux, en particulier ceux pratiqués chez les vertébrés. Plusieurs guides techniques destinés aux industriels, en cours d'élaboration, ont pour objectif de préciser la stratégie d'acquisition des informations sur les propriétés des substances, afin d'en limiter les essais en ayant recours à des méthodes alternatives ou en tenant compte des résultats de l'évaluation des risques (**tableau 2**). En ce qui concerne l'évaluation des risques pour la santé humaine, des stratégies intégrées comprenant l'utilisation de tests *in vitro* et *in silico* sont proposées pour les études de toxicité aiguë des substances chimiques, de leur tolérance locale (irritation/la corrosion cutanée), de sensibilisation cutanée et respiratoire à leur application, de leur toxicité lors d'administration par doses répé-

- **Étape 1 :**  
Collecter et partager les informations existantes (dont les données *in vitro* existantes)
- **Étape 2 :**  
Identifier les informations nécessaires
- **Étape 3 :**  
Identifier les informations manquantes (réaliser de nouveaux tests *in vitro*, *ex vivo*)
- **Étape 4 :**  
Produire les nouvelles données/Proposer une stratégie d'essais (générer des nouvelles données *in vitro* ou *in vivo*)

**Tableau 2 :** REACH Implementation Project 3.3 (RIP 3.3) : élaboration de guides techniques qui proposent des approches par étapes intégrant les méthodes substitutives à l'expérimentation animale. Schéma général.

Propriété étudiée	Méthode(s) substitutive(s)	Modèle utilisé
<b>Mutagenèse (5 méthodes)</b>	1. Essai de mutation reverse (TG OCDE 471) 2. Essai de mutation génique (TG OCDE 481) 3. Essai d'aberration chromosomique <i>in vitro</i> (TG OCDE 473) 4. Essai <i>in vitro</i> de mutation génique (TG OCDE 476) 5. Essai <i>in vitro</i> d'échange de chromatides sœurs (TG OCDE 479)	1. Bactéries 2. Bactéries 3. Cellules 4. Cellules 5. Cellules
<b>Corrosion cutanée (3 méthodes)</b>	1. Essai de résistance électrique transcutanée (TG OCDE 430) 2. Essai sur modèle de peau humaine (TG OCDE 431) 3. Méthode d'essai <i>in vitro</i> sur membrane (TG OCDE 435)	1. Explant de peau (rat) 2. Épiderme 3D 3. Membrane acellulaire
<b>Absorption cutanée (1 méthode)</b>	Méthode <i>in vitro</i> (TG OCDE 428)	Explant de peau (humaine et de rat)
<b>Photo-toxicité (1 méthode)</b>	Essai de photo-toxicité 3T3 NRU (TG OCDE 432)	Lignée cellulaire
<b>Irritation cutanée (1 méthode)</b>	En cours d'adoption	Épiderme 3D

**Tableau 3 :** Bilan des méthodes substitutives réglementaires appliquées aux substances chimiques (dont les ingrédients des produits cosmétiques). Ces méthodes font l'objet de Lignes Directrices (Test Guidelines, TG), identifiées par un code international par l'OCDE.

tées, de leur photo-toxicité, de leur toxicité sur la reproduction, de cancérogénicité, de mutagénicité). Des exemples sont donnés dans le **tableau 3**.

## CONCLUSION

Des progrès scientifiques considérables ont permis le développement de modèles pertinents pour évaluer les effets toxiques des médicaments ou produits chimiques sur la santé humaine et la qualité de l'environnement. Cependant, dans l'état actuel de nos connaissances, les méthodes alternatives ne peuvent pas se substituer à l'animal lorsque les études portent sur l'organisme entier. En effet, les méthodes *in vitro*, même utilisées en batterie complémentaire, ne peuvent reproduire les mécanismes de régulation complexes et d'interactions entre cellules et organes. En revanche, la mise en place de stratégies dites « intelligentes »

intégrant le principe des 3R, telles que celles proposées dans le programme REACH, permettront de réduire de manière significative l'expérimentation animale. Des collaborations plus efficaces au niveau international doivent maintenant se mettre en place aussi bien au niveau des structures de validation, ECVAM, ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the validation of alternative methods), JaCVAM (Japanese center for the validation of alternative methods) qu'au niveau des autorités réglementaires (UE, OCDE, ICH), pour que les méthodes validées soient réellement appliquées. Enfin, la collaboration entre les différents secteurs industriels, de la chimie, du médicament, du produit cosmétique, doit être encouragée afin d'éviter la répétition des efforts de recherche, de favoriser le partage des données sur les substances mais également le partage de l'expérience acquise sur les méthodes alternatives à l'expérimentation animale.

## BIBLIOGRAPHIE

- Rapport de la commission au conseil et au parlement européen. COM (2007) 675 final. Cinquième rapport 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.
- Règlement REACH, Règlement CE N°440/2008 de la Commission du 30 mai 2008. Journal Officiel de l'Union Européenne L142.
- Hendriksen, C. 2007. Three Rs achievements in vaccinology. In Proceedings of the 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences. Alternatives to animal testing and experimentation, pp. 575–579.
- Memorandum on Actual Status of Alternative Methods on the Use of Experimental Animals in the Safety Assessment of Cosmetic Ingredients in the European Union. 2007. Comité scientifique des produits de consommation (SCCP).
- Toxicity testing in the 21<sup>th</sup> century. A vision and a strategy 2007. The National Research Council of the national academies. The national academies press, Washington DC.
- Proceeding of ICH, Tokyo Symposium-Hot topics and Influence of Asia, Tokyo 2007.
- Proceeding of EDQM. Alternatives to animal testing. New approaches in the development and control of biologicals. Dubrovnik, Croatia, 23-24 avril 2008.
- Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. Résumé des considérations du rapport des groupes d'experts de l'OCDE sur la toxicité à court et long terme.

