République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
École Nationale Supérieure Vétérinaire

ENSV
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE
ALGER

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

THÈME

LES METHODES SUBSTITUTIVES A L'EXPERIMENTATION ANIMALE

Présenté par :KINANE Imene

Soutenu le : 03-07-2017

Devant le jury composé de:

- Président :Dr.HAMDI Taha Mossadak Professeur
- Promoteur : Dr. ZOUAMBI Boualem Maitre-assistant classe A
- Examinateur 1:Dr. BAAZIZI Ratiba Maitre-assistant classe A
- Examinateur 2 :Dr. AINOUZ Lynda Maitre-assistant classe A

Année universitaire : 2016/2017

Dédicace

A ma très chère mère Djamila.

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

Puisse Dieu, le tout puissant, t'accepter dans son vaste Paradis.

Remerciement

En préambule, je veux adresser tous mes remerciements aux personnes avec lesquelles j'ai pu échanger et qui m'ont aidé pour la rédaction de ce mémoire.

En commençant par remercier tout d'abord mon directeur de recherche de ce mémoire Monsieur **Boualem ZOUAMBI**, pour son aide précieuse et pour le temps qu'il m'a consacré.

Je voudrais également remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour toutes leurs remarques et critiques.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma petite **famille**, mes **proches** surtouts **KERBOUI Marya** et tous mes **ami e s**, qui m'ont accompagné, aidé, soutenu et encouragé tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Merci à vous tous

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction ……1

I. Partie théorique :

Chapitre I : L'expérimentation animale

1. Qu'est-ce qu'une expérience sur animaux ?.....4
2. Justification scientifique de la recherche animale ……..4
3. Dans quels domaines réalise-t-on des expériences sur les animaux ?.....4
   3.1.Exemples ……..5
      3.1.1. Animaux génétiquement modifié ……5
      3.1.2. La fibrose cystique……5
4. L'expérimentation /obligation légale ……6
5. Donnée statistique……...6
   5.1.Les objectifs des expérimentations menées……..6
   5.2.Quelque chiffre sur le développement des médicaments……7
   5.3.L'expérimentation animale en suisse……8
   5.4.L'expérimentation animale dans l'union européenne……...8
   5.5.Types d'espèces utilisées au sein de l'union européenne……9

Chapitre II : Maintien du bien être l'animale = l'éthique

1. Notion de stress et de bien – être……..11
   1.1.Stress……...11
   1.2.Bien – être……...11
   1.3.Evaluation du bien – être ……...11
   1.4.Bien – être = 5 libertés……11
2. L'expérimentation animale est classifiée selon leur degré de gravité……..11
   2.1.Sans contrainte : degré de gravité 0……11
   2.2.Contrainte légère : degré de gravité 1……11
   2.3.Contrainte moyenne : degré de gravité 2……11
   2.4.Contrainte sévère : degré de gravité 3……12
3. La douleur de l'animale au cours d'une expérimentation ……12
4. Résumé des dates clés d'éthique……...13
5. Une stratégie…La règle des 3R : Replace, Reduce, Refine……..14
   5.1.Replace : le remplacement……..14
      5.1.1. Exemple : des cellules sanguines sauvent 500 000 lapins par an...15
   5.2.Reduce : la réduction ……..15
      5.2.1. Exemple : l'imagerie ……..16

5.3.Refine : l'amélioration des techniques ……16
5.3.1. Exemple : Enrichissement : Quand le box contient plus que de la litière……...16
5.4.Le quatrième R : la Responsabilité ……...16
6. Réglementation de la protection animale ……17
6.1.Loi N°76-629 du 10 juillet 1976 relative à la protection de la nature …...17
6.2.Code sanitaire pour les animaux terrestre – OIE 2013……...17
chapitre 7.8 : « utilisation d'animaux pour la recherche et l'enseignement »
6.3.Directive 2010/63/EU sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques :……..18
6.4.Loi suisse sur la protection des animaux, art. 4 – Principes……...18
7. La problématique de l'expérimentation animale……...19
7.1.La différence des réactions chez l'homme et chez l'animale……19
7.1.1. Exemple de l'échec de la recherche sur le cancer du poumon …..19
7.1.2. Exemple des maladies génétiques ……..…19
7.1.3. Autres exemples de réactions différentes chez l'homme et l'animal……...20
8. Les préparations «***me-too***» (préparations analogues)……..21

Chapitre III : Les méthodes substitutives à l'expérimentation animale

1. Définition ……23
2. Argument en faveur des méthodes sans expérimentation animale……...24
3. Les moyens de recherche sans expérimentation animale ……..…25
3.1.Microdosage ……...24
3.2.In vitro ……25
3.3.In silico ……...26
3.4.Les bio puces ……..27
3.5.Procédures d'imagerie ……28
3.6.Recherche clinique……..28
3.7.Méthodes en enseignement et formation sans douleur et sans animal……29
3.8.Conclusion……..29
4. Les méthodes réglementaires validées……30

II. Partie expérimentale: la recherche des pyrogène dans les produits pharmaceutiques à usage parentérale (produits obligatoirement stériles)

1. Initiation ……...33
2. Essais ……34
2.1.Recherche des substances pyrogènes……..34
2.2.L'essai au Lysat d'Amoebocytes de Limule (L.A.L)…….....39
2.2.1. Définition ……...39
2.2.2. Les méthodes d'essai LAL…….....39
2.2.3. Principe ……..39
2.2.4. Comparaison entre les méthodes LAL……...41
2.2.5. Méthode par gélification ……...41

2.2.5.1.Recherche des endotoxines bactériennes dans des poches du sérum physiologique ……...41
2.2.5.2.Contrôle LAL test…….....46
2.2.5.3.Conclusion……...48
3. Discussion ……49
3.1.Choix de la méthode……..50
3.1.1. Les tests in vivo……..……50
A. Avantages…….……50
B. Inconvénients ……..…….50
3.1.2. Les tests in vitro……..……51
A. Avantages……..…...51
B. Inconvénients ……...51
3.2.De point de vue critique ……53
4. En concluant……..53
5. Recommandation …….....54
5.1.Des cellules sanguines humaines ……...54

Conclusion ……...56

Références bibliographiques……57

Liste des figures

- **Figure 1 :** des exemples de manipulation sur animale selon le degré de douleur élaboré par le comité d'éthique……...12
- **Figure 2 :** les étapes de la réalisation de la biopuce…….27
- **Figure 3 :** PVC Rat……29
- **Figure 4 :** appareil pyrogène test ……..34
- **Figure 5 :** fiche de résultats- essai des pyrogènes ……37
- **Figure 6 :** schéma du principe de la réaction permettant les dosages par gélification et turbidimétrie ……40
- **Figure 7 :** schéma du principe de la réaction permettant les dosages chromogéniques…….40
- **Figure 8 :** l'absence et la présence de gélification……44
- **Figure 9 :** les principales réactions provoquer par l'injection d'endotoxine……49

Liste des tableaux

- **Tableau 1 :** exemples de réactions chez l'homme et chez l'animale……20
- **Tableau 2 :** méthodes de remplacement en expérimentation animale : validation et statut réglementaire au 31 décembre 2009……..30
- **Tableau 3 :** interprétation des résultats du test pyrogène sur Lapin ……37
- **Tableau 4 :** comparaison entre les méthodes d'essai LAL……...41
- **Tableau 5 :** mode de distribution des réactifs de test LAL ……..44
- **Tableau 6 :** les résultats de l'essai LAL avec les interprétations……..45
- **Tableau 7 :** comparaison des résultats des deux séries de dilution de l'essai préliminaire……47
- **Tableau 8 :** les calcules de la moyenne géométrique des deux gammes de dilutions…..48

Liste des abréviations

- **AATEX:** Alternative pour Animal Testing and Experimentation
- **AMS :** Accelerator Mass Spectrometry
- **AQ:** Assurance Qualité
- **ATLA:** Alternative To Laboratory Animals

- **BPF:** Bonne Pratique de Fabrication
- **BPL:** Bonne Pratique de Laboratoire
- **CAAVS :** Communauté d'Action Anti Vivisection Suisses
- **CSE:** Endotoxine Standard de Controle
- **ECVAM:** European Centre for the Validation of Alternative Methods
- **ELC:** Concentration Limite en Endotoxine
- **FAO:** Food and Agriculture Organization of the united nations
- **FC :** Fibrose Cystique
- **FDA:** Food and drug administration
- **GIS :** Groupementd'IntérêtScientifique
- **ICCVAM :** Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
- **LAL:** Lysat d'Amoebocyte de Limule
- **LPA :** Loi sur la Protection des Animaux
- **LPS:** LipoPolySaccharide
- **LSCV :** Ligue Suisse Contre la Vivisection
- **MG:**MoyenneGéométrique
- **MVD:** Dilution Maximal Valide
- **OCDE :** Organization de Coopération et de Développement Economiques
- **OIE:** Organisation Mondiale de la Santé animale
- **OPAL :** Offices Publics de l'Aisne et de Laon
- **OPAn :** Ordonnance sur la Protection des Animaux
- **OVF :** Office Vétérinaire Fédéral
- **PBPK :** Physiologically Based Pharmaco Kinetic
- **QSAR :** Quantitative Structure Activity Relationship
- **RSE:**Endotoxine Standard de Reference
- **SPA :** Société Protectrice des Animaux
- **UE:** Union European
- **UE:** Unite Endotoxine
- **UFAW :** Universities Federation for Animal Welfare

INTRODUCTION

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

Ainsi, la directive européenne 86/609/CEE a été le point dedépart 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*.

Les méthodes substitutives 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 processusde validation apportant la preuve de leur équivalence avecla méthode de référence réalisée chez l'animal.

Cette étude a pour objectif le maintien du bien être animale (notion d'éthique) en évitant tout douleur aux cours de l'expérimentation animale, 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.

Alors, pourquoi utilise-t-on des animaux alors que la recherche animale ne fournit pas des données pertinentes ni prédictives pour l'homme surtout avec la présence de différence même minimes des réactions chez l'homme et chez l'animale ?

A cet effet nous avons fait une étude comparative entre un test in vivo et un test in vitro, et nous avons choisie comme modèle la détection des endotoxines dans les solutions injectables obligatoirement stérile.

Les tests choisis selon la disponibilité au niveau de l'établissement SAIDAL sont : test pyrogène sur Lapin (in vivo) et test lysat d'amoebocyte de Limule LAL (in vitro).

Partie théorique

Chapitre I : L'EXPERIMENTATION ANIMALE

1. Qu'est-ce qu'une expérience sur animaux?

« Selon l'Ordonnance sur la protection des animaux (OPAn), toutes les expériences comportant un animal ne sont pas considérées comme une expérience sur animaux. Le champ d'application de cette ordonnance s'étend à tous les vertébrés, aux décapodes et aux céphalopodes. Une expérience avec un ver de terre ou une mouche du vinaigre n'est donc pas une expérience sur animaux. **» (Centre didactique biotech, 2013)**

2. Justification scientifique de la recherche animale :

L'expérimentation animale a une grande importance dans la recherche médicale moderne sur de nombreuses pathologies (maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, maladies infectieuses et développement de vaccins, maladies métaboliques comme le diabète, etc.). Elle sert également à développer les nouvelles techniques chirurgicales (greffes, microchirurgie ou neurochirurgie).**(GIS, 2012)**

Si de nombreuses expériences sur animaux sont réalisées lors du développement d'un nouveau médicament, l'entreprise qui produit ce médicament est pratiquement protégée par la loi contre tout recours: «Ce médicament a été testé abondamment par l'expérimentation animale et classée comme sans risque.» En effet, même si l'on peut partir du principe qu'il y aura des effets indésirables massifs la seule condition à cet égard est de les mentionner sur la notice d'emballage.**(CAAVS, 2013)**

Tout le monde ne peut pas non plus se déclarer d'accord avec les expériences sur animaux. Pourquoi procède-t-on en réalité à ce type d'expériences? Voici quelques réponses : **(centre didactique biotech, 2013)**

- Pour apprendre à mieux comprendre les processus qui se passent dans notre corps et qui sont identiques chez les animaux.
- Pour découvrir les causes des maladies et des possibilités de traitement.
- Pour garantir l'efficacité et la sécurité d'emploi de médicaments et de denrées alimentaires.

3. Dans quels domaines réalise-t-on des expériencessur les animaux?

Les expériences sur animaux sont réalisées dans la recherche médicale, pharmacologique et toxicologique, dans la psychologie et la psychiatrie, dans l'industrie chimique et cosmétique,

dans le développement de systèmesd'armement, dans la recherche alimentaire, dans la recherche environnementale, nucléaire,… etc.

En outre, de très nombreuses expériences sont pratiquées sur des animaux à des fins éducatives dans les universités.

Plus d'un tiers des expériences sur les animaux sont réalisées dans l'industrie, près de la moitié dans les hautes écoles et les hôpitaux.**(CAAVS, 2013)**

3.1.Exemples :

3.1.1. Animaux génétiquement modifié

Les animaux génétiquement modifiés sont très appréciés par la recherche car ils permettent de trouver des réponses à des questions insolubles par d'autres moyens. L'avantage des expériences réalisées avec ces animaux génétiquement modifiés (transgéniques) est que l'intervention dans le patrimoine héréditaire n'est pas due au hasard comme dans le cas d'un croisement. On peut au contraire inactiver (knock-out) ou ajouter (knock-in) un gène de manière ciblée. Ces animaux permettent d'observer sur l'organisme vivant l'effet d'une modification génétique.

3.1.2. La fibrose cystique :

Les souris transgéniques ont par exemple permis de faire nettement progresser la recherche sur la maladie héréditaire la plus courante en Europe de l'Ouest, la fibrose cystique (FC). Un enfant sur 2000 environ est atteint de FC. **(Christopher Anderegg et al. 2006)**

Les poumons de ces enfants produisent des muqueuses épaisses dont la toux ne les débarrasse pas. Il n'y a pas encore de traitement permettant de guérir la FC, mais grâce aux souris FC, on en sait aujourd'hui beaucoup plus sur cette maladie. Mais même les souris transgéniques ne permettent pas de répondre à toutes les questions en suspens: de nombreuses maladies humaines ne sont pas dues à la modification d'un seul gène, mais aux interactions entre plusieurs gènes qui ne font pas ce qu'ils devraient. Les experts sont d'avis que la possibilité de transférer les données de l'animal à l'homme peut varier fortement d'un cas à l'autre.**(Christopher Anderegg et al. 2006)**

L'inconvénient est que la production d'une souche de souris transgéniques peut durer très longtemps et nécessiter un grand nombre d'animaux: l'élaboration peut prendre plusieurs mois ou même plusieurs années.

«Il n'existe en fait que deux raisons d'être pour les expériences sur animaux: soit parce qu'elles font gagner un salaire, soit parce qu'on sait trop peu de choses à leur sujet. »

Werner Hartinger, drméd. **(CAAVS, 2013)**

4. L'expérimentation /une obligation légal :

La définition de l'expérience sur les animaux figure dans la loi sur la protection des animaux (LPA) à l'article 3, alinéa c:
Expérience sur les animaux: toute intervention au cours de laquelle des animaux vivants sont utilisés pour: **(Le conseil fédérale suisse. 2005)**

- Vérifier une hypothèse scientifique
- Vérifier les effets d'une mesure déterminée sur l'animal
- Tester une substance
- Prélever ou examiner des cellules, des organes ou des liquides organiques, sauf si ces actes sont réalisés dans le cadre de la production agricole ou d'une activité diagnostique ou curative sur l'animal, ou dans le but de vérifier le statut sanitaire de populations animales
- Obtenir ou reproduire des organismes étrangers à l'espèce
- L'enseignement, la formation ou la formation continue.

Art. 18, al. 1, LPA :Toute personne qui entend effectuer des expériences sur les animaux doit être titulaire d'une autorisation de l'autorité cantonale compétente. : **(Le conseil fédéralesuisse. 2005)**

La directive européenne 2010/63 affirme la nécessité du recours à l'expérimentation animale pour le progrès médical et définit les conditions dans lesquelles elle peut être pratiquée dans l'Union européenne.**(Recherche animal. 2013)**

Espèces animales - Les animaux vertébrés, leurs formes larvaires ou embryonnaires évoluées et les céphalopodes sont concernés par la directive, qu'ils soient destinés aux études in vivo (utilisation d'animaux vivants) ou in vitro (utilisation d'organes ou de tissus).

5. Donnée statistique **:**

5.1.Les objectifs des expérimentations menées :

La recherche fondamentale en biologie et la recherche et le développement en médecine humaine, animale et dentisterie sont de loin les secteurs qui utilisent le plus grand nombre

d'animaux, avec près de deux tiers du total. L'évolution la plus inquiétante concerne le nombre d'animaux utilisés pour les études de biologie fondamentale qui s'est considérablement accru (plus de 700 000 animaux), faisant grimper le pourcentage total de 38% en 2008 à 46% en 2011. Cela est dû notamment à l'augmentation importante des souris et des poissons. **(Rapport de la commission au conseil et au parlement européen. 2013).**

La seconde branche majeure requérant l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales est la production et le contrôle de qualité en médecine humaine, vétérinaire et dentisterie (13,9 %). Avec augmentation d'utilisation des Lapins dans ce domaine (plus de 81 000 animaux). **(Commission Européenne, 2013)**

Le troisième groupe d'expériences couvre les essais toxicologiques et autres évaluations de sécurité. Si l'ensemble de cette catégorie ne représente que 8,75% du nombre total. En effet le pourcentage le plus élevé d'animaux utilisés (47,5%) correspond aux tests de toxicité aiguë et subaiguë. Et la proportion d'animaux utilisés pour ces essais n'a cessé d'augmenter, passant respectivement de 36 % à 42 %, puis à 45 % et enfin à 47,5 %. **(Rapport de la commission au conseil et au parlement européen. 2013).**

Enfin, les autres objectifs d'expérimentation représentent 9 % du nombre total des animaux et couvrent un large éventail d'utilisations, telles que la virologie, l'immunologie, la recherche et le développement pharmaceutiques, les essais d'associations de médicaments ou encore la génétique.

Il est important de noter qu'il y a eu une augmentation nette de plus de 115 000 animaux utilisés pour les études sur les maladies cardiovasculaires, et de plus de 250 000 pour les études sur les cancers humains. **(Rapport de la commission au conseil et au parlement européen. 2013).**

5.2.Quelque chiffre sur le développement des médicaments :

90 % des moyens de recherche sont dépensés pour des maladies qui ne représentent que 10 % des années de vie en bonne santé perdues dans le monde. Ce chiffre démontre que l'aspect principal de la recherche n'est pas passé sur la nécessité, mais sur le plus profitable.

Dans les 25 dernières années :**(CAAVS. 2013)**

- ✓ 179 nouveaux remèdes contre les maladies cardio-vasculaires
- ✓ 111 médicaments contre le cancer ont été développés.

- ✓ Contrela tuberculose, une maladie typique des pauvres, dont plus de 1,7 million de personnes meurent chaque année, trois médicaments seulement ont été développés.

Jusqu'à 200'000 médicaments différents sont commercialisés chaque année dans le monde.

Sur les millions de médicaments déjà développés, seuls 300 sont considérés par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme vraiment nécessaires.

Un rapport de *Health Action International* 2011 montre que «sur 546 produits sur le marché contre la toux et les refroidissements … pas moins de 456 représentent des combinaisons insensées. L'utilisation de trois quarts des 356 analgésiques sur le marché ne devrait pas du tout être conseillée, car ils sont dangereux, inefficaces, insensés ou inutilement chers.»

5.3.L'expérimentation animale en suisse :

Dans son communiqué du 28 juin 2012 à l'occasion de la publication des statistiques, l'Office vétérinaire fédéral (OVF), annonce un « net recul du nombre d'animaux utilisés ».**(Ligue suisse contre la vivisection, 2012)**

Selon les chiffres, 662'128 animaux ont été utilisés, ce qui représente effectivement une baisse de 13,1% par rapport à 2010. Sauf que les chiffres en 2010 étaient en hausse de 7,9% par rapport à 2009. **(LSCV. 2012)**

Alors comment interpréter ces chiffres, publiés année après année ?

En premier lieu, une autorisation pour pratiquer une expérimentation animale est valable durant trois ans. Une étude prévoyant d'expérimenter en tout 3000 animaux peut donc en utiliser 100 la première année, 100 la deuxième et 2800 la troisième. Ou l'inverse, selon sa planification.

On y voit que l'on utilise plus d'animaux aujourd'hui qu'à la fin des années 1990. Bien qu'aujourd'hui, les méthodes substitutives aient remplacé les animaux dans de nombreuses procédures et que les données récoltées peuvent être analysés beaucoup plus finement, ce qui réduit d'autant le nombre d'animaux pour une expérience. Une étude qui nécessitait 500 animaux en 1990, en utiliserait peut-être une centaine aujourd'hui.**(LSCV. 2012)**

5.4.L'expérimentation animale dans l'Union Européenne **:**

La France reste le leader de la vivisection avec 2,2 millions d'animaux, suivie par l'Allemagne (2.07 millions) et le Royaume-Uni (2.05 millions). **(LSCV. 2012)**

5.5.Types d'espèces utilisées au sein de l'Union Européenne :

Les souris sont l'espèce les plus utilisée (61%) suivies par les rats (14%). Tous les rongeurs représentent 80% des animaux sacrifiés. Même si de baisses significatives ont été rapportées concernant l'utilisation de rats (500 000 animaux), de souris (aux alentours de 122 000) et de cobayes (environ 50 000), le nombre de lapins a fortement augmenté (plus de 25%).

La proportion totale de rongeurs utilisés reste néanmoins stable par rapport à celle des statistiques antérieures.**(Commission européenne,2013)**

La deuxième catégorie principale est composée à sang froid (12,5%). L'augmentation de cette catégorie par rapport à 2008 est due essentiellement à la hausse du nombre de poissons utilisés (+ 310 307).

Viennent ensuite les oiseaux (5,9 %) dont le nombre total a diminué pour la première fois.

Le quatrième groupe, avec 1,2% du total, inclut les artiodactyles et les périssodactyles, reste stable avec toutefois une augmentation des chevaux, ânes et croisement utilisés

Les carnivores, dont les chats et les chiens, totalisent 0,25% des animaux utilisés. La catégorie des « autres carnivores », autrement dit les espèces sauvages est en augmentation.**(Commission européenne, 2013)**

Les primates non humains représentent 0,05% des animaux utilisés en 2011, et une forte diminution de toutes les catégories de primates a été rapportée. **(Compagne pour l'abolition de la vivisection, 2013)**

Enfin, les autres mammifères comprenant sangliers, chauve-souris et musaraignes, lamas, taupes, bisons d'Europe et cerfs, ne représentent d'une partie infime des animaux utilisés, mais cette catégorie est en augmentation également.**(Compagne pour l'abolition de la vivisection, 2013)**

Chapitre II : MAINTIEN DU BIEN ETRE DE L'ANIMALE =L'ETHIQUE :

1. Notions de stress et de bien-être :**(Catherine OIRY – CUQ. 2016)**

1.1.Stress : incapacité prolongée à éliminer une source de danger entrainant une activation des systèmes d'adaptation au-delà de leurs limites d'efficacité maximale.

Réponse à une menace.

1.2.Bien-être: état de complète santé mentale et physique. L'animal est en harmonie avec son environnement. Absence de souffrance (émotions négatives = peur, douleur…)

1.3.Evaluation du bien-être :

- Caractérisation des besoins et préférences (excellente connaissance des espèces, comportements…)
- Evaluation de l'inconfort (modifications comportementales, physiologiques)

1.4.Bien-être = 5 libertés

- Absence de maladie et de blessure
- Absence de faim, soif, malnutrition
- Présence d'abris appropriés, confort
- Absence de peur et d'anxiété
- Possibilité d'exprimer les comportements de l'espèce

2. L'expérimentation animale est organisée selon leur degré de gravité :**(CAAVS. 2013)**

2.1.Sans contrainte: degré de gravité 0

Interventions et manipulations sur des animaux dans un but expérimental qui n'occasionnent aux animaux aucune douleur, aucun mal ou dommage, qui ne provoquent pas de grande anxiété et ne perturbent pas notablement leur état général.

2.2.Contrainte légère: degré de gravité 1

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

2.3.Contrainte moyenne: degré de gravité 2

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

2.4.Contrainte sévère: degré de gravité 3

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

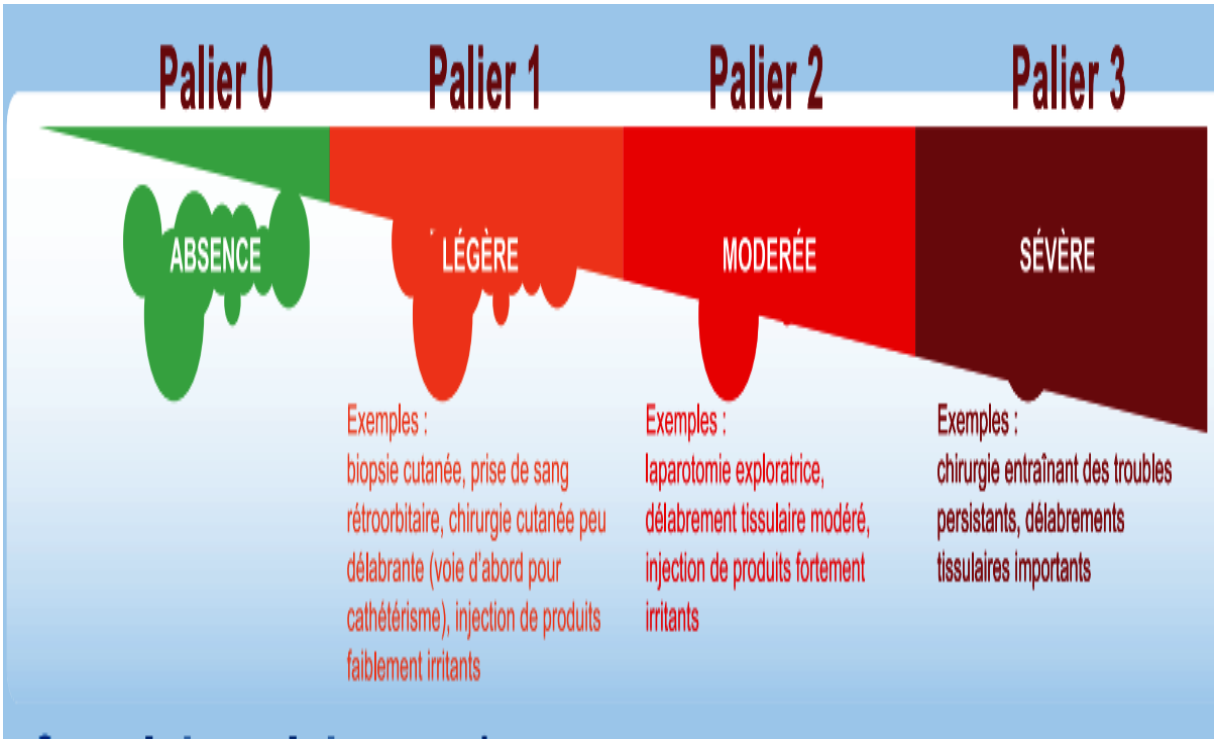


Figure 1: Des exemples de manipulation sur animale selon le degré de douleurélaboré par le comité d'éthique

3. La douleur de l'animale au cours d'une expérimentation :

La *douleur*est une *expérience*sensorielle et/ou émotionnelle désagréable causée par une atteinte tissulaire réelle ou potentielle qui provoque des réactions motrice et végétatives protectrices conduisant à la modification du comportement spécifique de l'individu.**(Comité d'éthique. 2002)**

Le chercheur doit suivre les recommandations formulées par RusseletBurch en 1952:

La règle des 3 R (Réduire, Raffiner, Remplacer)

4. Résumé des dates clés d'éthique :

Conditions et principes éthiques/cadre légale du statut animal et expérimentation animale

1831	•Marshall Hall établit des recommandations déstinées à **améliorer le bien-etre des animaux**
1845	•création de la **société protectrice des animaux (SPA)**
1850	•**la loi Grammont** sanctionne les mauvais traitements infligés aux animaux lorsque ces actes sont commis en public
1937	•**création de l'U.F.A.W.** (Universities Federation for Animal Welfare-Fédération universitaire pour le bien-etre animal)
1947	•**code Nuremberg:** le constement éclairé est obligatoire pour mener des recherche chez l'homme
1959	•**règle des 3R:** reduire,refiner,remplacer
1968	•**autorisation par décret des experiences** ou recherches scientifique ou experimentales sur les animaux
1976	•l'animal est "**un etre sensible" dans le code rural**
1986	•**directive européenne** sur l'experimentation animale
1989	•création de la **commission nationale de l'experimentation animal**
2001	•création des **comités éthiques**
2005	•création du **comité national de réflexion éthique en experimentation animale**
2009	•publication de la **charte nationale de l'experimentation animale**
2013	•**transposition de la directive européenne** dans le code rurale français
2014	•l'animal est "**un etre sensible" dans le code civil**
Fin 2016	•**conférence européenne sur les méthodes d'experimentation non animale**
Fin 2017	•**révision** de la directive européenne

5. Une stratégie … La règle des 3 R :Replace, Reduce, Refine

Selon RUSSELL et BURCH : *"Good welfareis a pre-requisite for good science"*:(Le bien-être est un pré requis pour une science de bonne qualité).

«*Une science sans cruauté est une bonne science et le meilleur moyen d'atteindre ce but est l'application rigoureuse des 3R*», disait Rex Burch. Et il ajoutait: «*L'idée des 3R doit être considérée comme une chance et non comme un danger*.»

Remarque :Il n'existe pas de traduction française du terme "refine" commençant par un "R" qui soit à la fois satisfaisante et univoque.

Un courant de préoccupation pour la limitation des souffrances infligées aux animaux de laboratoire a pris naissance en 1937 en Angleterre et se concrétisa par la création de l'U.F.A.W. (UniversitiesFederation for Animal Welfare - Fédération universitaire pour le bien-être animal).

Son objectif était simple : puisque l'expérimentation animale est indispensable, autant faire en sorte qu'elle soit réalisée le plus correctement possible. Ce courant trouva une formulation par la règle des trois « R » « replace (remplacer), reduce (réduire) et refine (améliorer) » introduite par RUSSELL et BURCH.

Cette règle a pour origine une suggestion de Charles HUMES fondateur de l'U.F.A.W.. RUSSELL et BURCH ont étéchargés d'une étude sur les méthodes "humaines" en expérimentation animale, ce qui les a amenés à écrire le livre princeps « The principle of humane experimental technique » en 1959.

5.1.Replace : Le remplacement

RUSSELL et BURCH définissent le remplacement comme étant toute méthode scientifique employant un modèle non sensible qui pourrait, dans l'évolution de l'expérimentation animale, remplacer les méthodes utilisant des êtres vivants et conscients.

Un chercheur doit vérifier s'il existe une telle méthode avant d'utiliser un animal vivant.

Les techniques pouvant remplacer le recours à l'animal de laboratoire peuvent être classées en deux catégories : celles qui remplacent totalement, et celles qui sont relatives. On peut citer, entre autres exemples, les simulations sur ordinateur, les études épidémiologiques, les travaux réalisés sur organes maintenus en survie artificielle, les cultures cellulaires et les nouvelles méthodes d'imagerie médicale et de télémétrie. La recherche sur les tissus

humains est également une solution qui se développe progressivement. **(Sophie Emmanuelle PICAVET, 2004)**

5.1.1. Exemple : Des cellules sanguines sauvent 500 000 lapins par an

Le 21 mars 2006 a été une date importante de l'expérimentation sur de nombreux lapins de laboratoire: un comité scientifique de l'UE a recommandé cinq méthodes de substitution pour le test pyrogène. Le test pyrogène sert au contrôle de qualité, pour détecter les impuretés dans les produits médicaux. Maintenant, ce test peut être effectué à l'aide de cellules. On n'a plus besoin de lapins. Selon les estimations d'experts, ces nouvelles méthodes sauvent la vie de 200 000 lapins par an dans l'UE et d'un demi-million de lapins dans le monde entier.**(Centre didactique biotech, 2013)**

5.2.Reduce : La réduction

RUSSELL et BURCH suggèrent la réduction du nombre d'animaux utilisés à un minimum nécessaire et suffisant à l'obtention des informations et des précisions recherchées.**(Sophie Emmanuelle PICAVET, 2004)**

Ce qui est réalisable par plusieurs méthodes ; complémentaire si nécessaire :

- limitation aux seules expériences considérées comme absolument indispensables
- rédaction d'un protocole expérimental minutieux avant toute expérimentation pour avoirdes résultats concluants, aidant à ne pas vérifier les résultats par d'autres séries d'animaux
- exploitation optimale des données obtenues lors d'une expérimentation antérieure.
- éviter les répétitions expérimentales inutiles par la mise en place de bases de données facilement accessibles ;
- utilisation de statistiques lors de la conception du protocole expérimental pour une estimation préalable du nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables ;
- utilisation d'animaux homogènes au niveau des caractères biologiques, et de leur état sanitaire, afin de réduire autant que possible les variations individuelles par rapport aux effets expérimentaux mesurés.

5.2.1. Exemple : l'imagerie

Dans l'industrie pharmaceutique, au lieu de tuer les animaux à différentes phases pour les examiner,les chercheurs observent le déroulement de l'effet d'un principeactif sur l'animal en faisant plusieurs fois des clichés du même animal. **(Centre didactique biotech, 2013)**

5.3.Refine **:** L'amélioration des techniques

Ce troisième principe concerne aussi bien les techniques utilisées que l'environnement des animauxpeut également être présentécomme ayant l'objectif « d'améliorer le bien-être » plutôt que de « diminuer la souffrance »

On entend par «refinement» toutes les mesures destinées à réduire la contrainte, la douleur et la souffrance des animaux avant, pendant et après une expérience.**(Sophie Emmanuelle PICAVET, 2004)**

5.3.1. Exemple :Enrichissement: quand le box contient plus que de la litière

Les souris et les rats de laboratoire passent leur vie en cage. Diverses études démontrent que les rongeurs vivant dans des cages nues sont perturbés au niveau du développement cérébral, présentent des anomalies du comportement et se montrent peureux.

Pour prévenir ces troubles, il est possible d'enrichir les cages, c'est-à-dire que celles-ci contiennent par exemple un abri, du papier, de petites branches et des dispositifs permettant aux animaux de grimper.

Diverses études ont montré que les rongeurs utilisent effectivement ces possibilités lorsqu'elles sont disponibles et sont, de ce fait, moins peureux et ont un comportement plus normal.**(Centre didactique biotech, 2013)**

5.4.Le quatrième R : La responsabilité

Le quatrième R est introduit implicitement dans un nouveau concept, celui dit « des Alternatives ».

Selon BALLS, les personnes mettant en place les tests devraient se responsabiliser moralement et ne pas se contenter de reporter leur responsabilité sur les autorités. Il met ainsi en place un quatrième R : la Responsabilité, devant s'appliquer à tous ceux qui ont un rapport de près ou de loin avec l'expérimentation.

Le concept des alternatives est de nos jours internationalement admis et il est retrouvédans des centres comme l'ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods en Grande-Bretagne) ou dans des journaux spécifiques à l'application de la règle des trois « R » tels que : AATEX (Alternative to Animal Testing and EXperimentation au Japon), TAR (The Alternative Report aux Etats-Unis) et ATLA (Alternative To Laboratory Animals en Grande-Bretagne). **(Sophie Emmanuelle PICAVET, 2004)**

6. Réglementation de la protection animale :

La réglementation découle principalement du concept introduit par RUSSELL et BURCH présenté précédemment : la règle des trois « R ». Au plan international, une ligne directrice générale a été publiée, puis les réglementations communautaires et nationales ont suivi. Même si le principe de base est fondamentalement le même, la mise en pratique n'est pas harmonisée. En conséquence, les laboratoires sont tenus à des obligations qui diffèrent selon les pays. **(Sophie Emmanuelle PICAVET, 2004)**

6.1.Loi n° 76-629 du 10 juillet 1976 relative à la protection de la nature : **(Catherine OIRY – CUQ, 2016)**

- **Code rural** (Article 276)

- Animal = être sensible

-Animal a un propriétaire responsable

-Interdiction d'exercer des mauvais traitements

-Expériences biologiques médicales et scientifiques doivent être limitées au strict nécessaire

- **Code pénal** (Articles 454, 521, 654, 655)

- Sera puniquiconque aura pratiqué des expériences ou recherches scientifiques ou expérimentales sur animaux sans se conformer aux prescriptions

- Sanctions (contraventions. Peut aller jusqu'à l'emprisonnement)

6.2.Code sanitaire pour les animaux terrestres - Chapitre 7.8.:**« Utilisation d'animaux pour la recherche et l'enseignement » : (OIE, 2013)**

- Selon l'**Article 7.8.1. :**

Point limite: désigne le moment à partir duquel la souffrance et/ou le stress d'un animal d'expérimentation doi(ven)t être évité(es), supprimé(es), atténué(es) ou réduit(es) au moyen

de mesures telles que l'administration de traitementsoulageant la souffrance et/ou la détresse, l'arrêt de la procédure douloureuse, le retrait de l'animal de l'étude oul' euthanasie de l'animal dans des conditions décentes.

- Selon l'**Article 7.8.5. :**

Un des éléments essentiels du programme de soins et d'utilisation des animaux est de vérifier que le personnel aucontact des animaux est suffisamment formé et compétent pour travailler avec les espèces utilisées, exécuter lesprocédures à suivre et tenir compte des considérations éthiques.Le personnel concerné doit donc pouvoir bénéficierde la formation continue, nécessaire à son développement professionnel et para-professionnel.

6.3.Directive 2010/63/EU sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques **: (Journal officiel de l'Union européenne, 2010)**

- L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques ou éducatives devrait être envisagée uniquement lorsqu'il n'existe pas de méthodes alternatives n'impliquant pas l'utilisation d'animaux**.** (texte 12)
- Il est nécessaire de veiller à ce que l'utilisation d'animaux dans les procédures ne présente pas de menaces pour la biodiversité. Il y a donc lieu que l'utilisation d'espèces menacées soit limitée au strict minimum.(texte 16)
- D'un point de vue éthique,il convient d'interdire les expériences occasionnant de graves douleurs, souffrances ou angoisses susceptibles de se prolonger sans rémission possible.(texte 23)

6.4.Loi suisse sur la protection des animaux, art. 4 – Principes. **(Conseil fédéral, 2005)**

- Toute personne qui s'occupe d'animaux doit:
  - tenir compte au mieux de leurs besoins;
  - veiller à leur bien-être dans la mesure où le but de leur utilisation le permet.
- Personne ne doit de façon injustifiée causer à des animaux des douleurs, des maux ou des dommages, les mettre dans un état d'anxiété ou porter atteinte à leur dignité d'une autre manière. Il est interdit de maltraiter les animaux, de les négliger ou de les surmener inutilement.

7. La problématique de l'expérimentation animale :

7.1.La différence des réactions chez l'homme et chez l'animale :

Selon une étude mandatée en 2004 par l'organisation Européens pour le progrès médical [Europeans for Medical Progress], en Grande-Bretagne, 82 % des médecins généralistes disent s'inquiéter du fait que «les données animales risquent d'induire en erreur lors - qu'elles sont appliquées à l'homme».

Une quantité considérable de documents à l'appui confirment que les expériences sur les animaux sont inefficaces et peu fiables, contrairement aux méthodes récemment mises au point – qui sont plus valables et moins onéreuses que les études effectuées sur les animaux.**(Djexreveur. Daniel JAGLINE, 2010)**

7.1.1. Exemple de l'échec de la recherche sur le cancer du poumon :

Les études prospectives et rétrospectives sur des patients humains, par exemple, avaient déjà montré avant 1963 la forte interaction entre la consommation de cigarettes et le cancer du poumon.

Or, presque tous les efforts expérimentaux entrepris pour générer un cancer du poumon chez les animaux avaient échoué. En conséquence, Clarence Little, un éminent chercheur dans le domaine du cancer chez les animaux, a écrit: «L'échec de nombreux chercheurs qui ont tenté de créer, dans une phase de test d'une durée de 50 ans, un cancer expérimental, fait naître – à l'exception de quelques cas isolés – de sérieux doutes en ce qui concerne la validité de la théorie corrélant les cigarettes au cancer du poumon.»

Par conséquent, les avertissements sanitaires ont pris un retard de nombreuses années, retard pendant lequel des milliers de personnes ont continué de succomber à un cancer du poumon.

Au début des années 40 déjà, des examens cliniques effectués sur l'homme ont clairement démontré que l'amiante provoque le cancer. Or, vu que ces résultats n'ont pas été confirmés par des études réitérées sur les animaux, les Etats-Unis n'ont appliqué de véritables mesures de protection sur les lieux de travail que des décennies plus tard. **(Christopher Anderegg et al.2006)**

7.1.2. Exemple des maladies génétiques :

Les scientifiques ont décelé les défauts génétiques de nombreuses maladies héréditaires, y compris la fibrose cystique et le cancer du sein héréditaire. Pour tenter de «simuler» ces

maladies chez les animaux, les scientifiques utilisent la plupart du temps des animaux – des souris, le plus souvent – présentant des défauts génétiques spontanés ou produits en laboratoire. Les maladies génétiques reflètent toutefois les interactions entre le gènedéfectueux, les autres gènes et l'environnement expérimental. En conséquence, presque tous ces modèles ont échoué dans leur tentative de reproduire les traits essentiels des conditions humaines analogues.

Ainsi, si les souris transgéniques porteuses du même défaut génétique que les humains atteints de fibrose cystique ne présentent pas les obstructions du pancréas ou les infections pulmonaires dont souffrent les humains atteints de cette maladie, c'est parce que les souris et les hommes ont des systèmes métaboliques différents. **(Christopher Anderegg et al.2006)**

7.1.3. Autres exemples de réactions différentes chez l'homme et l'animal

Tableau 1 : Exemples de réactions chez l'homme et chez l'animale (CAAVS. 2013)

Substance chimique/ naturelle:	Pour l'homme:	Résultat dans l'expérience sur animaux:
l'arsenic	mortel à faibles doses	toléré par les moutons et autres ruminants à hautes doses
l'aspirine	analgésique, antipyrétique et anti-inflammatoire	pour les chats, particulièrement lors d'une administration répétée, extrêmement toxique. peut causer de graves malformations dans la progéniture des chiens, des singes, des souris et des rats
l'insuline	hormone essentielle à la vie, médicament important	entraîne des malformations chez le lapin, la poule et la souris
la morphine	utilisable pour le traitement de douleurs graves et pour la tranquillisation	menace la vie à haute dose chez les souris et chez les chats
le para-cétamol	analgésique et antipyrétique	toxique pour les chats. Entraîne à haute dose une défaillance hépatique/la mort
la pénicil-line	le premier antibiotique bactéricide	elle est toxique, voire mortelle pour les hamsters, les cochons d'Inde et les lapins
la thalido-mide (Contergan)	entraîne des malformations extrêmement graves chez la descendance	inoffensive pour les souris et les rats

8. Les préparations «***me-too***» (préparations analogues):

Ce qui est particulièrement lucratif, c'est le développement de médicaments contre des symptômes qui sont normaux ou qui concernent tout le monde une fois ou l'autre. Ces symptômes englobent le manque d'initiative, la fatigue, le manque de libido, la nervosité, le manque d'appétit, la chute de cheveux, etc.

Un autre point principal est les préparations «***me-too***» (préparations analogues ou imitations). Ce sont des préparations identiques ou des variations minimes de médicaments existant déjà (normalement de médicaments à fortes ventes de la concurrence ou de propres médicaments dont la protection du brevet arrive à expiration).

Ces copies sont produites pour avancer dans un nouveau marché ou pour développer la dominance du marché dans un secteur.

Les préparations « ***me-too*** » n'ont aucune utilité, ou une utilité supplémentaire marginale pour le patient. Mais elles occasionnent presque autant d'expériences sur animaux et de frais supplémentaires pour les patients que les médicaments nouvellement développés. **(CAAVS, 2013)**

«Si l'on examine d'un oeil critique le projet d'expérience, on voit qu'une grande partie des expériences ont lieu pour des motifs purement commerciaux ou par ambition personnelle.» '*Prof. Wolfgang Scharmann, Office fédéral de la santé publique'*. **(CAAVS, 2013)**

Chapitre III : LES METHODES SUBSTITUTIVES A L'EXPERIMENTATION ANIMALE :

1. Définition :

Méthode expérimentale qui ne recourt pas à l'animal vertébré vivant ("in vivo") :**(Catherine OIRY – CUQ, 2016)**

- Soit parce qu'il n'y a pas d'utilisation d'animaux(échantillons de tissus humains, modélisation informatique)
- Soit parce qu'on utilise des animaux invertébrés (drosophiles, vers, moules). Ces animaux peuvent être utilisés vivants, ou pour fournir des cellules utilisées par ex. en biologie moléculaire.
- Soit parce qu'on utilise des produits issus d'animaux de laboratoire(organes,tissus, cellules) sans que l'animal lui-même ne soit soumis à une expérience(animal est élevé, anesthésié pour le prélèvement et euthanasiéimmédiatement).
- Désigne une méthode qui utilise l'animal sans ne lui infliger aucune douleur, enremplacement d'une technique dite "invasive" (qui nécessite un actechirurgical)
  Ex: remplacer la chirurgie par une échographie
  Ex: résonnance magnétique / images en coupe dans différents plans /reconstruire en 3D une structure du corps
- Les méthodes substitutives s'inscrivent dans le principe des 3R(Réduire, Raffiner, Remplacer)

<u>La substitution ou le remplacement :</u>

Les alternatives de remplacement désignent les méthodes qui évitent ou remplacent l'utilisation des animaux dans un domaine où il est d'usage de les utiliser, en employant du matériel humain/l'homme:In vitro; in silico; procédures d'imagerie; microdosing; recherche clinique…etc

« l'organisation d'un colloque sur le thème :' Place des méthodes de remplacement en expérimentationbiologique 'OPAL-FRANCOPA 2015'» : s'adresse à tous les professionnels de l'expérimentation animale, également aux membres des comités d'éthique en expérimentation animale qui doivent être à même de vérifier l'application stricte de l'obligation de remplacement quand il est possible**. (OPAL, 2015)**

2. Argument en faveur des méthodes sans expérimentation animale :**(CAAVS, 2012)**

- les résultats sont directement transmissibles. Grâce aux méthodes de recherche sans expérimentation animale, il est même possible d'aborder de manière ciblée des gens avec besoins spéciaux (vieillesse, certaines restrictions) ou habitudes de vie individuelles (alimentation, tabagisme).
- Grâce au choix et à la culture de cellules spéciales, on peut aborder très exactement in vitro les questions posées et les besoins de l'homme. ainsi, il est possible par exemple de cultiver in vitro des cellules cutanées humaines des différents types de peau (type de peau i – Vi) et de tester directement des substances de crème solaire sur les différents types de peau.
- contrairement à l'expérimentation animale, les méthodes de recherche sans expériences sur animaux doivent être contrôlées quant à leur pertinence, leur sécurité et leur fiabilité, afin de pouvoir être acceptées et autorisées officiellement.
- avec ces méthodes, ce n'est pas la réaction d'un individu qui compte comme indicateur de la nocivité d'une substance pour une espèce déterminée d'être vivant.
- les méthodes de recherche sans expériences sur animaux fournissent des résultats clairs, univoques et objectifs dans des conditions contrôlées.
- la constitution de banques de données permet un échange d'informations entre différents laboratoires et conduit à des découvertes importantes.
- les déroulements des tests sont compréhensibles et peuvent être reconstruits avec exactitude si nécessaire.
- Les systèmes réagissent aux influences toxiques de manière considérablement plus sensible que l'animal vivant.
- les méthodes de recherche sans expériences sur animaux fournissent des résultats beaucoup plus rapidement. Acela s'ajoute que divers tests peuvent être automatisés et se dérouler en parallèle.
- comme les méthodes sans expériences sur animaux sont ciblées et opportunes, elles permettent une recherche beaucoup plus productive que l'expérimentation animale.

3. Les moyens de recherches sans expérimentation animale :

3.1.Microdosage :

Grâce à l'association de Microdosing et d'accelerator Mass Spectrometry (AMS), l'effet des substances de test peut être examiné directement sur l'homme. la substance de test est alors administrée à un dosage tellement faible que la substance n'a aucun effet pharmacologique et qu'elle ne peut être détectée dans le corps de la personne qu'au moyen d'une analyse de précision (AMS). En comptant les différents atomes, AMS est à même de détecter des quantités infimes de la substance testée dans des échantillons de sang et d'urine. Au moyen de prises de sang régulières, le chemin de la substance peut être suivi.

La métabolisation, la distribution, l'absorption et l'élimination d'une substance de test peuvent ainsi être déterminées de manière exacte et véridique sur l'homme avec diverses conditions physiques qui entraînent des maladies.

3.2.in vitro :

La recherche in vitro englobe une grande abondance de méthodes diverses. Toutes permettent la recherche sur une matière organique à l'extérieur du corps. Les prélèvements d'échantillons chez les patients permettent d'obtenir des cellules humaines spécifiques. Celles-ci peuvent être établies sur un terrain nourricier approprié et «cultivées». Les cellules cultivées gardent ainsi leur comportement naturel. Les processus cellulaires, par exemple le métabolisme cellulaire, peuvent être examinés précisément à l'aide de cultures de cellules et de tissus.

Grâce à diverses techniques et aussi à l'emploi d'adjuvants comme les bioréacteurs ou les récipients d'incubation, il est possible de constituer des tissus en trois dimensions et de produire des systèmes d'organes entiers. Les bioréacteurs et récipients d'incubation assurent les conditions typiques de l'organisme, l'approvisionnement et l'échange de substances. Aumoyen de techniques in vitro, on peut par exemple reproduire l'œil humain avec toutes ses couches. **(CAAVS, 2012)**

Grâce aux cultures, la plupart des processus peuvent être étudiés dans le corps humain dans n'importe quelles circonstances manipulables (système immunitaire, maladies). L'effet de substances testées peut être recensé et évalué avec précision dans des circonstances réalistes.

3.3.In silico :

Les méthodes in silicodésignent les modèles biomathématiques utilisant des bases de données et des procédures analytiques issues des expérimentations in vitro et in vivo. La bio-informatique permet de disposer de modèles descriptifs du vivant à différentes échelles, de l'organisme entier à la cellule en construisant de modèles moléculaires.

Grâce à des méthodes comme le modelage in silico, les propriétés (structure moléculaire, effet et toxicité) d'une substance et ses effets sur d'autres substances ou points à l'intérieur du corps humain peuvent être déterminés avec une très grande exactitude. Il est donc possible de découvrir la constitution chimique d'une substance pour qu'elle puisse agir dans le corps au bon endroit et de la manière requise.au moyen d'une procédure de la chimie analytique, il est possible notamment d'analyser les propriétés chimiques de substances et de détecter les plus petits composants de substance. **(CAAVS, 2012)**

Diverses méthodes in silico ont été développées dans cecontexte et deux de ces méthodes ont été présentées lorsdu colloque : la modélisation structure-activité pour lierla structure d'une molécule à son activité biologique, etl'extrapolation quantitative de résultats observés in vitro à dessituations in vivo.**(Céline BROCHOT, Enrico MOMBELLI, 2016)**

- La modélisation structure-activité fait l'hypothèse que desmolécules présentant des structures chimiques similairesont des activités biologiques similaires. Plusieurs méthodes,avec différents niveaux de complexité ou de formalismemathématique, sont utilisées pour définir la similarité chimique.
  - La lecture croisée « readacross »
  - la modélisation quantitative QSAR (Quantitative StructureActivityRelationship), Quatre modèles existe : (CAESAR,SARPY, TTVEGA, T.E.S.T)
- Méthodes de modélisation à l'échelle atomiquepermettent de déterminer la structure tridimensionnelle, l'énergieainsi que d'autres propriétés chimico-physiques des molécules et des systèmesbiologiques à partir de leur composition atomique.

L'efficacité des modèles biomathématiques comme méthodes de substitution repose sur la richesse, laqualité et la pertinence des données sur lesquelles ils se fondent ; mais certaines méthodes couplées (QSAR/PBPK (Physiologically Based Pharmaco Kinetic) :Les travaux 2013-2020 de larecherche à l'INERISporteront sur l'optimisation et la validation de

méthodes mathématiques qui soutiennent la toxicologie et l'éco toxicologie prédictivepourraient fournir une prédiction de qualité équivalente à l'expérimentation in vivo.**(Françoise Dupuy Maury, 2016)**

3.4.Les biopuces :

Une biopuce réunit les techniques in vitro et in silico. En principe, c'est une micropuce qui joue le rôle de porteur de cellules et qui peut représenter selon l'emploi des cellules un certain système miniaturisé. On peut établir non seulement des cultures cellulaires spéciales, mais même des organes ou un système d'organisme complet. La biopuce permet une analyse extrêmement rapide de toutes sortes de données sur un très petit espace.

Il est ainsi possible d'examiner la métabolisation d'une substance déterminée dans un système réaliste et cohérent.

Les conditions dans lesquelles doit se dérouler l'examen peuvent aussi être changées selon la question posée. Ainsi p. ex. on peut aborder de manière ciblée des conditions physiques spéciales qui entraînent des maladies. La distribution et l'effet d'une substance de test peuvent être suivis de près et leurs produits de décomposition localisés avec précision.**(CAAVS, 2012)**

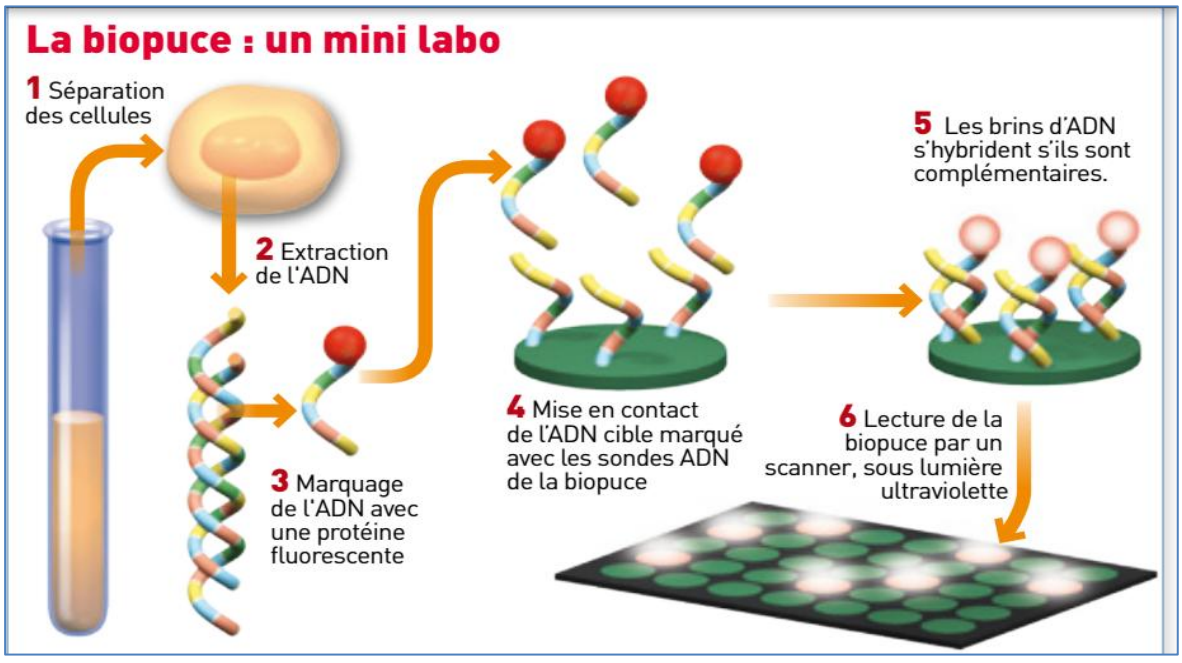


Figure 2 : les étapes de la réalisation de la biopuce

3.5.Procédures d'imagerie :

Grâce aux diverses procédures d'imagerie modernes, les processus dans le corps humain peuvent être rendus visibles sur un moniteur. Ainsi par exemple, il est possible d'observer le cerveau au travail au moyen d'une tomographie fonctionnelle par résonance magnétique et de constater ainsi quelles zones du cerveau sont actives dans diverses circonstances et comment elles réagissent à certaines influences. Il est également possible aujourd'hui de traiter (marquer) une substance de test de telle manière qu'elle puisse être observée dans le cerveau au moyen d'une tomographie d'émissions de positrons. Leur distribution et leur enrichissement peuvent être de cette manière localisés et mesurés très précisément.

Au moyen d'une spectroscopie par résonance magnétique, toutes sortes de substances, comme les neurotransmetteurs par exemple, peuvent être déterminés et mesurés dans le cerveau.

Ceci renseigne notamment sur les moyens et les manières d'influencer les processus métaboliques dans le cerveau.

Comme le patient est conscient lors de ces méthodes douces, dites non invasives (procédures lors desquelles aucun appareil ni aucune sonde ne pénètre dans le corps), il peut communiquer son état pendant l'examen**. (CAAVS, 2012)**

3.6.Recherche clinique :

La recherche clinique se sert des découvertes issues des traitements de patients. Dans cette méthode de recherche, des données de traitement de patients sont recueillies et saisies. Cela permet à la recherche de tirer des conclusions directes et d'utiliser l'analyse des données pour d'autres traitements. Ainsi, la recherche clinique peut notamment donner la direction pour la réduction des effets indésirables de la thérapie. L'étude des parallèles et variations entre différents effets de thérapies fournit une contribution importante au développement de stratégies de traitement.

Bien que la majeure partie de l'état actuel des connaissances médicales se base sur l'observation de malades, cette méthode de recherche reste largement inutilisée dans la pratique. **(CAAVS, 2012)**

3.7.Méthodes en enseignement et formation sans douleur et sans animale :

Dans le domaine de l'animale de laboratoire, plusieurs modèles sont disponibles et bien connus pour s'entrainer au gavage et au prélèvement sanguin (Koken rat). Il existe également des modèles chirurgicaux plus ou moins performant : comme le PVC Rat : pour pratiquer les interventions et les micro-tubes développés par KEZLEX :

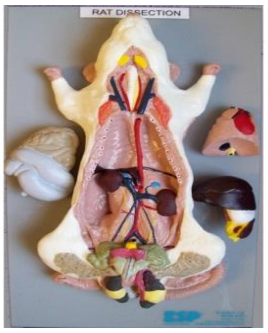


Figure 3: PVC Rat

présentent des caractéristiques de plasticité sensiblementanalogues à ceux d'un vaisseau.**(Dr Catherine VOGT, 2016)**

3.8.Conclusion :

Les scientifiques assurent: pour l'instant, si on veut continuer à soigner l'Homme – et l'animal–, on ne peut s'en passer. En revanche, ils soulignent aussi la nécessité de la limiter au maximum, de tenir compte du bien-être animal et de développer des solutions substitutives solides.

4. Les méthodes règlementaires validées :

Tableau 2 : Méthodes de remplacement en expérimentation animale : Validation et statut réglementaire au 31 décembre 2009

Produits chimiques	
Méthode réglementaire (in vivo)	**Méthode substitutive validé (in vitro)**
Absorption cutanée	**Explant de peau** (lors d'une utilisation d'échantillons de peau prélevés sur des humains)(OCDE 428, UE 2008)
Corrosion cutanée	**-corrositex®(**pour l'etude des acides et des bases) (OCDE 435/2006) -essai sur modele de peau humaine reconstruite (**EPISKIN™, EpiDerm™, SkinEthic™**) (OCDE 431/2004 et 2006,UE : 440/2008/CE)
Irritation cutanée	essai sur modele de peau humaine reconstruite (**EPISKIN™, EpiDerm™, SkinEthic™**) (OCDE 2009, UE : 440/2008/CE)
Cancérogénicité	**Essai de transformation cellulaire** sur les cellules SHE et Balb/3T355
Effets endocriniens	**Essai de l'activité oestrogénique** sur cellules MCF-7 (ICCVAM)
Photo toxicité	essai de **photo toxicité sur cellules 3T3 NRU** (OCDE 432/2004, UE : 67/548/CEE)
Essais spécifiques aux médicaments biologiques	
A usage humain	
Efficacité des vaccins (test sérologique d'activité du vaccin contre la poliomyélite 'inactivé', chez le rat)	**Quantification des antigènes** (UE, Pharmacopée Européenne)
Innocuité des vaccins (toxicité résiduelle du vaccin contre la diphtérie 'essai chez cobaye'	**Dosage sur lignées cellulaires Véro d'anatoxines diphtériques** (UE, Pharmacopée Européenne)
Produits biotechnologiques non vaccinaux (essai de DL50 chez la souris comme test d'activité pour les toxines botuliniques)	**Essai sur l'endopeptidase,** protéine de 20 kDa**associéeausynaptosomes** (SNAP 25) (Pharmacopée Européenne)

<table>
<tr><td rowspan="3">Pyrogénicité</td><td rowspan="2">Essai chez le Lapin</td><td>-les IL-1 dans le sang humain entier
-les IL-6 dans le sang humain entier
-les IL-6 dans la MM6
-les IL-6 dans les PBMC (cellules mononuclées de sang périphérique)
- les IL-1 dans le sang humain entierCryo conservé</td><td>UE/ ECVAM 2006
USA/ ICCVAM 2008</td></tr>
<tr><td colspan="2">Essai sur lysat d’amoebocytes de limule, appelé aussi essai de détection d’endotoxines bactériennes.(UE/ Pharmacopée Européenne (5.0), FDA/ Pharmacopée américaine(USP 85), pharmacopée japonaise XIV)
<u>Remarque :</u> remplacement relatif : remplacement d’un animale dont la sensibilité élevée par un autre dont le potentiel de perception de la douleur est moins élevé</td></tr>
<tr><td>Essai sur lysat d’amoebocytes de limule, appelé aussi essai d’endotoxine bactérienne</td><td colspan="2">Essai de détection d’endotoxines bactériennes portant sur le facteur C recombinant.(USA)</td></tr>
<tr><td colspan="4">Produits alimentaires</td></tr>
<tr><td colspan="2">Test d’innocuité chez la souris</td><td colspan="2">Méthode de CLHP par pré colonne (méthode de Lawrence) (officielle 2005.06 de l’AOAC, FAO/OMS)</td></tr>
</table>

II. Partie expérimentale :

Recherche des pyrogènes dans les produits pharmaceutiques à usage parentéral (produits obligatoirement stériles)

1. Initiation :

Les normes de la pharmacopée imposent l'absence de substances pyrogènes dans les produits pharmaceutiques qui entrent en contact avec la circulation sanguine ou le système nerveux central.

Ces substances pyrogènes (→ susceptible de provoquer une augmentation de la température corporelle) sont notamment les endotoxines des bactéries gram -, constituées du Lipopolysaccharides (LPS), les bactéries gram +,les levures,les moisissures et les poussières chimiques.

Rappel : Les effets généraux des endotoxines

- Pyrogénicite entrainant maux de tête, myalgies, nausées...
- Leucopénie
- Hypotension pouvant être létale (choc endotoxinique)

Ces bactéries sont fréquentes dans les circuits d'alimentation en eau. Une eau, même stérile, peut contenir ces endotoxines à l'état de traces car elles sont très difficiles à éliminer : les endotoxines résistent à la chaleur et aux irradiations**. (Jaouida Ben Aouali, 2016)**

La recherche des pyrogènes est effectuée sur différents types de produits

- Industrie pharmaceutique
  - Matières premières, in-process, produits finis
  - Matériel médico-chirurgical
  - Produits sanguins
- Centre hospitalier - clinique - centre de dialyse
  - Eaux et produits de dialyse
  - Poches de nutrition parentérale
  - Solutions pour conservation d'organes

Limite acceptable pour l'homme est de 5 UE /kg/ heure.**(Fanny Demay, 2016)**

UE : Unité endotoxine : Unité normalisée par rapport au matériau de référence défini.

Par convention,1UE/m^3 correspond à 0,1ng/m^3 de l'étalon d'endotoxine de référence international (RSE) provenant d'Escherichia coli nommé EC-5(10 EU/ng d'*Escherichia coli.)*. En pratique, on utilise un étalon d'endotoxine de contrôle (CSE) qui est traçable par rapport à l'étalon d'endotoxine de référence trop onéreux et rare. L'actuel RSE utilisé aux Etats-Unis est appelé EC6 (E.coli O113 :H10 :K LPS). **(Laure Déléry, 2007)**

Il existe deux techniques qui permettent la détection des pyrogènes :

- Technique **IN VIVO** qui utilise le lapin **: Essai des pyrogènes**
- Technique **IN VITRO** qui utilise le Lysat d'Amebocytes de Limule : **Test au LAL**

2. ESSAIS :

2.1.Recherche des substances pyrogènes :

2.1.1. But :

Est la recherche des substances qui induisent l'élévation des températures corporelles (hyperthermie).

2.1.2. Domaine d'application :

On ne peut appliquer l'essai des pyrogènes que pour les produits ayant une monographie à la pharmacopée européenne ou autre.

Ce mode opératoire est applicable aux SMP (Soluté Massif Poche) produit fini et à la matière première glucose entrant dans la fabrication des solutés massifs.

2.1.3. Responsable de l'approbation :

Le directeur du laboratoire de contrôle de la qualité est responsable de l'approbation de ce mode opératoire.

2.1.4. Principe :

L'essai consiste à mesurer l'élévation de la température chez le lapin provoqué par l'injection d'une solution stérile du produit à examiner.

2.1.5. Mode opératoire :

Appareillage et matériel :

- Appareil pyrogène test processus type API 75, ELLAB, ayant une précision de 0,1°C. Muni de connections Type APT.SE 15. Compléter avec 15 Sondes de type A.RK29. (contrôleur de température corporelle des lapins).
- Chariot pour déplacement des lapins
- Chariot pour analyse
- Boite à contention pour lapin
- Bain marie thermostaté
- Seringues apyrogènes à usage unique (60ml)
- Aiguilles
- Feuilles en aluminium
- Balance pour la pesée des animaux
- Plateau en métal inoxydable
- Alcool éthylique 96°

Figure 4 :Appareil pyrogène test

Réactif chimique

- Eau stérile et apyrogène.

Animal utilisé :

- Lapin albinos :
  . Race : NEOZELANDAISE et CALIFORNIENNE
  . Sexe : male ou femelle
  . Poids : 1.5 - 4 Kg

2.1.6. Protocole

2.1.6.1.Préparation des solutions du glucose à injecter :

- La solution à injecter doit être au même titre que le produit fini ;
- Le volume à injecter est de 10ml/Kg, sauf indication contraire aux monographies individuelles
- La solution du glucose isotonique à une concentration de 5%,
- L'injection de 10 ml de solution de la même concentration par Kg de poids de l'animale engendre l'administration de : $\frac{5\times10\times POID}{100}$ **gramme** Glucose injecté à l'animal.
- Les solutions sont chauffées à une température de 38,5C° avant l'injection.

2.1.6.2.Essai préliminaire :

- Un à trois jours avant l'essai du produit, sélectionner au préalable un groupe du Lapins, et qui n'ont pas été utilisés pendant les 2 dernières semaines
- Mesurer la température initiale de chaque lapin à partir de 90 min au moins avant l'injection
- Injecter par voie intraveineuse 10ml/kg de poids vif d'une solution apyrogène de glucose 5g/100ml chauffée à une température voisine de 38,5 °C
- Déterminer la température maximale de chaque lapin dans les 3 heures qui suivent l'injection
- Chaque lapin présentant une variation de température supérieure à 0.6°C n'est pas utilisé dans l'essai définitif.

2.1.6.3.Essai définitif :

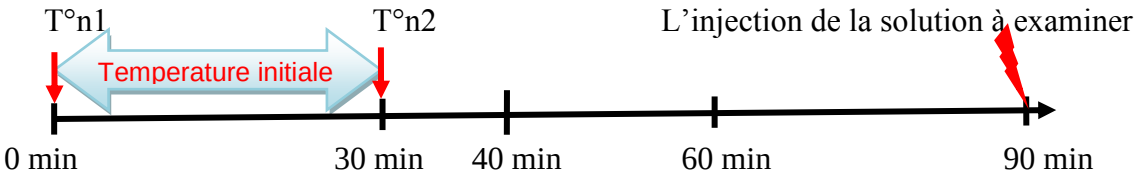
Insertion des sondes :

- Cette opération suit immédiatement la mise en place des lapins dans les boites à contention
- L'extrémité flexible de la sonde est introduite dans le rectum du lapin à une profondeur de 5 à 10 cm.

2.1.6.4.Détermination de la température initiale (Tini) :

- Les prises de températures se font dans les 90min avant l'injection.

- La température initiale de chaque lapin est la moyenne de deux valeurs déterminé à un intervalle de 30 min dans les 40 min qui précédant l'injection de la solution à examiner.
- Cette phase est la dernière étape de sélection.
- Les lapins retenus pour l'essai sont ceux qui présentent :



- ➢ Des températures initiales (Tini) comprises entre 38-39,8°C
- ➢ Des écarts qui ne dépassent pas 0.2°C entre deux lectures successives.
- ➢ Utiliser seulement les lapins dont les températures initiales ne s'écartent pas les unes des autres de plus de 1°C.

2.1.6.5.phase d'injection :

- dilater la veine marginale de l'oreille du lapin avec du coton imbibé d'alcool éthylique. L'injection de la solution préalablement chauffée à 38.5°C, se fait au niveau de la veine marginale de l'oreille du lapin.
- La durée de l'injection ne doit pas dépasser 4min, la quantité à injecter est de 10 ml /kg poids vif.

2.1.6.6.Détermination de la température maximale(Tmax) :

- La température maximale est la température la plus élevée, notée dans les 3 heures suivant l'injection de la solution à examiner ; mesurer les températures de chaque lapin à des intervalles réguliers de 15 min pendant 3heures

2.1.6.7.Détermination de la température différentielle de chaque Lapin (Δt) :

- La réponse de l'animal est définie par la différence entre la température maximale et la température initiale de chaque Lapin : (Δt=Tmax –Tini)
- Lorsque cette différence de température est négative, le résultat est considéré comme étant Zéro.

2.1.6.8.Détermination de la somme des réponses (∑ΔT) :

- La somme des réponses (∑ΔT) est la somme des trois valeurs de température différentielles des trois lapins auxquels l'échantillon a été injecté.

2.1.7. Interprétation des résultats :

- Le produit testé satisfait à l'essai si la somme des réponses des trois lapins n'est pas supérieure à 1.15°C
- Si cette somme dépasse la valeur de 1.15°C, procéder comme décrit au tableau ci-dessous :

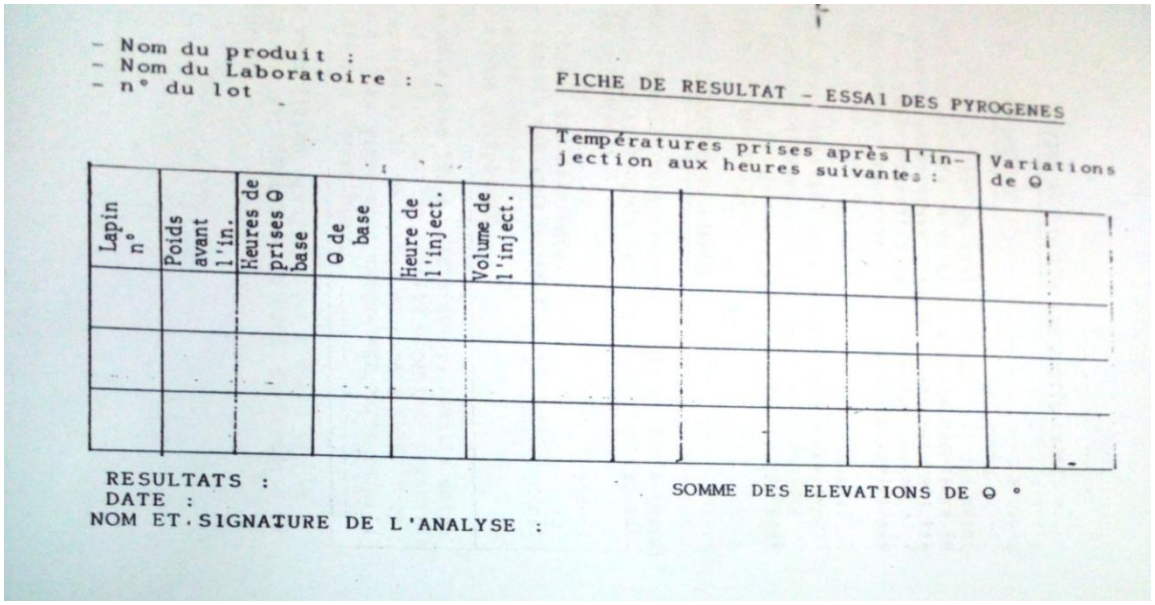
Tableau 3 :interprétation des résultats du test pyrogène sur Lapin

Nombre de Lapins	Le produit satisfait à l'essai, si la somme des réponses n'est pas supérieure à	Le produit ne satisfait pas à l'essai, si la somme des réponses est supérieure à
3	1.15°C	2.65°C
6	2.80°C	4.30°C
9	4.45°C	5.95°C
12	6.60°C	6.60°C

NB :

- Si pour 3 lapins la somme des écarts de températures se trouvent supérieure à 1.05°C mais inferieure à 2.65°C il faut poursuivre l'essai avec 6 lapins.
- Si pour 6 lapins la somme des écarts de températures se trouvent supérieure à 2.80°C mais inferieure à 4.30°C il faut poursuivre l'essai avec 9 lapins.
- Si pour 9 lapins la somme des écarts de températures se trouvent supérieure à 4.45°C mais inferieure à 5.95°C il faut poursuivre l'essai avec 12 lapins.

2.1.8. Fiche de résultats – essai des pyrogènes :


- Nom du produit :
- Nom du Laboratoire :
- n° du lot

FICHE DE RESULTAT - ESSAI DES PYROGENES

Lapin n°	Poids avant l'in.	Heures de prises Θ base	Θ de base	Heure de l'inject.	Volume de l'inject.	Températures prises après l'injection aux heures suivantes :						Variations de Θ	

RESULTATS :
DATE :
NOM ET SIGNATURE DE L'ANALYSE :

SOMME DES ELEVATIONS DE Θ °

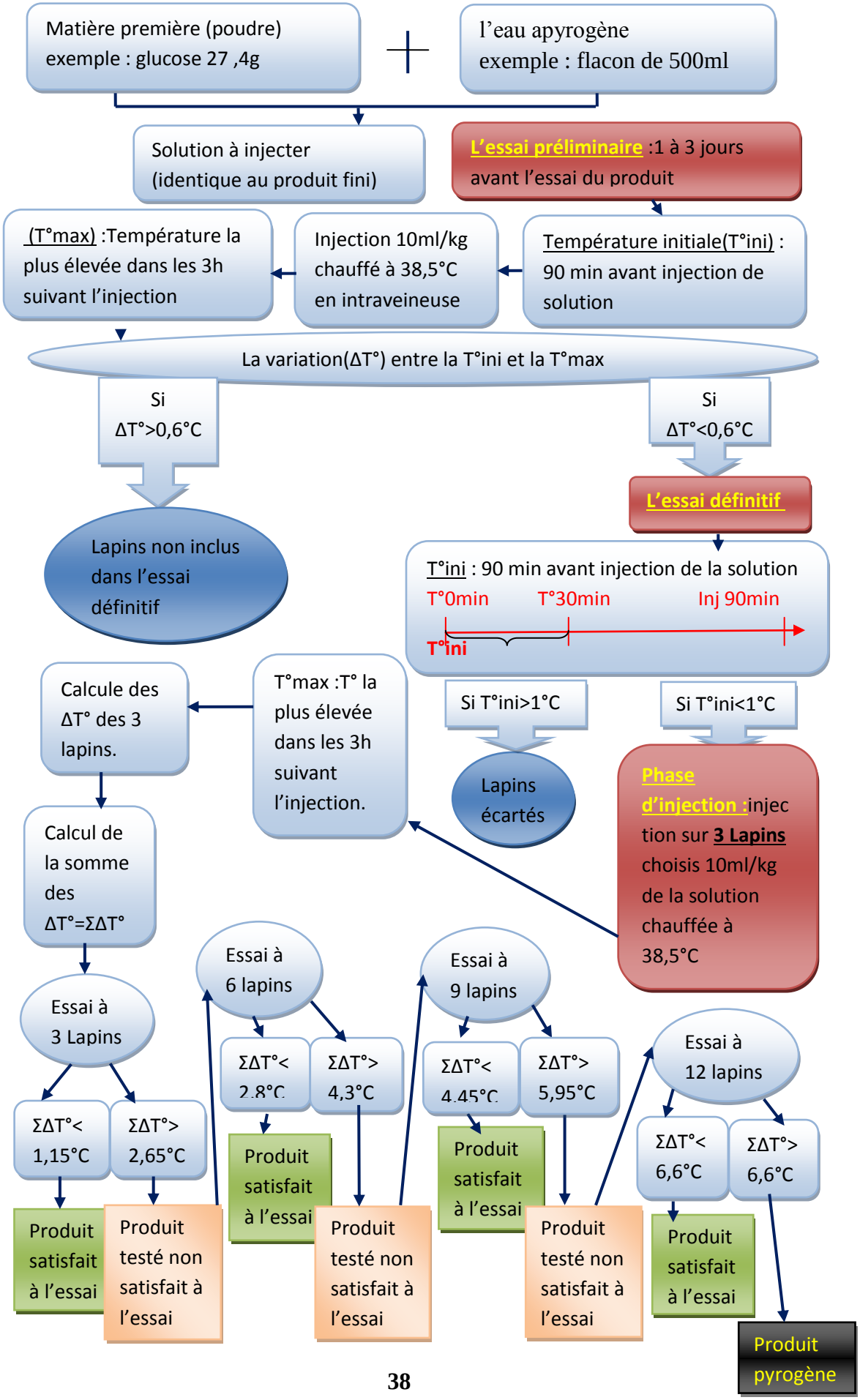
Figure 5 : fiche de résultats- essai des pyrogènes

2.1.9. Conclusion de l'essai :

Après avoir calculé le temps nécessaire pour les différentes tests du protocole et qui dure pour l'essai préliminaire 4h 30min et pour l'essai définitif 4h 34min (pour l'essai sur 3 Lapins) avec un intervalle de 1 à 3 jours et en plus l'essai définitif peut être 2 fois jusqu'à 4 fois plus longue si le produit testé est non satisfait à l'essai précédent.

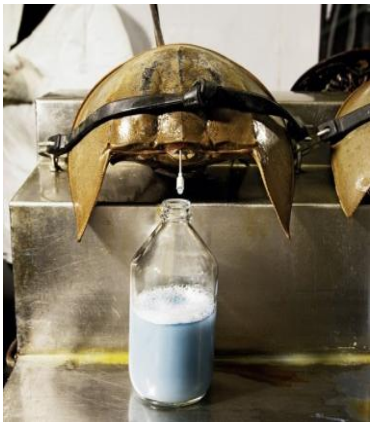
Donc on ne peut pas tester simultanément un groupe important et en peut dire que la recherche des pyrogènes sur Lapin prend beaucoup de temps.

2.1.10. Diagramme du protocole :



2.2.L'essai au lysat d'amoebocytes de Limule (L.A.L) :

2.2.1. Définition :



Lysat : produit de la digestion ou de la dissolution des cellules ou des bactéries par les lysines.

Le Limulus test ou test L.A.L. est une méthode de dosage des endotoxines bactériennes dans les produits injectables, se fait par une réaction enzymatique réalisée in vitro à l'aide d'un réactif ; le lysat d'amoebocytes de Limule (L.A.L) , obtenu par lyse des éléments figurés de l'hémolymphe (l'hémolymphe:sang : composé de plasma contenant l'oxygène liée a l'hémocyanine –équivalent de l'hémoglobine chez l'homme-et des cellules appelées Amoebocytes.) de limule ou polyphemus ou crabe en fer à cheval (limulus de sexe femelle vu sa grande taille et sa plus grande capacité en sang).

2.2.2. Les méthodes d'essai LAL :

→ <u>Avec détermination semi-quantitatives</u> :

- La méthode gel-caillot

→<u>Avec détermination quantitative :</u>

- La méthode turbidimétrique cinétique
- La méthode chromogénique (cinétique et en point final)

2.2.3. Principe :

Le limule n'ayant pas de système immunitaire, le gel formé suite au phénomène de coagulation lui permet de bloquer les infections bactériennes.

Le sang de Limule est très sensible à la présence des bactéries gram- ou de lipopolysaccharides (LPS), de sorte que la coagulation du sang se produit au contact de très faibles quantités de LPS injecté.

Ce phénomène de COAGULATION de l'hémolymphe de Limuluspolyphemus est à la base de l'essai au lysat d'amoebocytes de Limule(LAL) pour la détection in vitro des

endotoxinesbactériennes, fait suite à une série de réactions enzymatiques. Les facteurs C et G présent dans les amoebocytes, sont des facteurs initiateurs de la réaction.

Lors de la mise en présence du LAL et d'endotoxines, la formation de coaguline s'accompagne de l'apparition d'un trouble qui est à la base des méthodes LAL par turbidimétrie, tandis que les molécules de coaguline vont s'agréger pour former un gel qui est à la base des techniques LAL par gélification.**(*G.* Greff-Mirguet, 2002)**

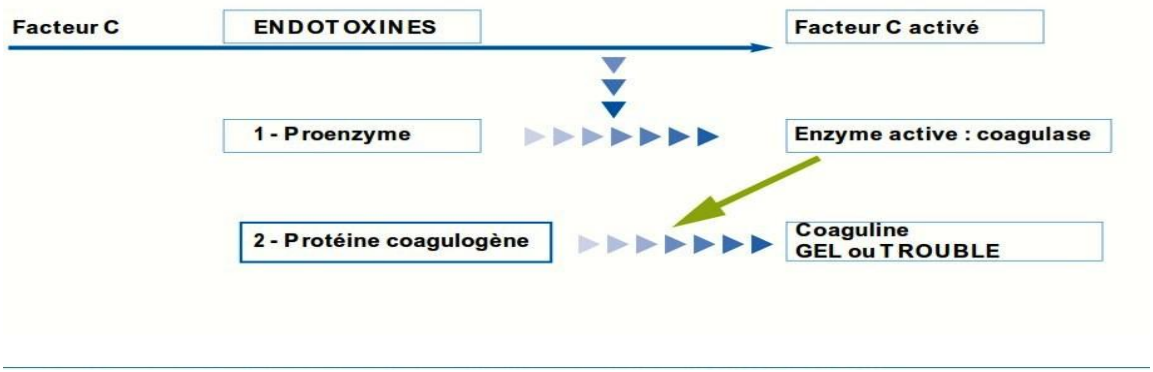


Figure 6 : Schéma du principe de la réaction permettant les dosages par gélification et turbidimétrie

La protéine coagulogène peut être éliminée du réactif LAL et remplacée par un substrat en libérant une substance colorée, la paranitroniline. C'est le principe des méthodes chromogéniques.**(G. Greff-Mirguet, 2002)**

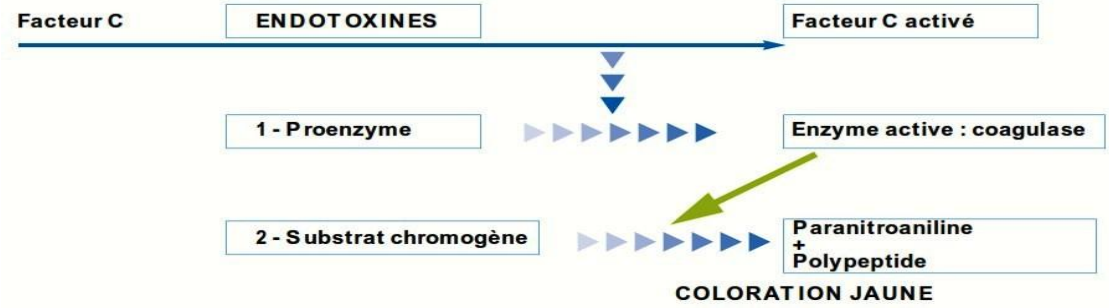


Figure 7 : schéma du principe de la réaction permettant les dosages chromogéniques

2.2.4. Comparaison entre les méthodes d'essai L.A.L :

Tableau 4:Comparaison entre les méthodes d'essai LAL

gel – caillot	Chromo génique point final	Chromo génique cinétique	Turbidimètrique
Semi-quantitative	Quantitative	Quantitative	Quantitative
Simple, le moins cher, nécessite bain de 37°C	spectrophotomètre ou lecteur de plaque	plaque incubation ou d'un lecteur de tube	plaque incubation ou d'un lecteur de tube
Lire et enregistrer manuellement	Manuelle ou peut être automatisé, permet le stockage de données électroniques	Automatisé, permet le stockage de données électroniques	Automatisé, permet le stockage de données électroniques
Sensibilité de 0.03 EU/ml	Sensibilité de 0.1 EU/ml	Sensibilité de 0.05 EU/ml	Sensibilité de 0.01 EU/ml
➢ Les sensibilités varient selon le fabricant de réactifs, instrumentation et les conditions d'essai			

2.2.5. Méthode par gélification :

Responsable de l'approbation : Le directeur du laboratoire contrôle de la qualité

2.2.5.1.Recherche des endotoxines bactériennes dans des poches du sérum physiologique :

A. Mode opératoire :

Domaine d'application :

Le test au LALne peut être appliqué que pour les produits ayant une monographie à la pharmacopée européenne ou autre.
Il est obligatoire d'observer, dans l'application de test au LAL les priorités suivantes :**(Laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques, 2000)**

➢ priorité élevée :

- les produits radio pharmaceutiques
- les produits contenant potentiellement de l'endotoxine (certains vaccins, des produits préparés par génigénétique)
- eau pour préparations injectables
- injections intraveineuses et intrarachidiennes moins de 15ml
- matériaux destinés à des préparations, en grands volumes, pour administration parentérale

➢ priorité moyenne :

- les préparations présentant une réactivité toxique ou pharmacologique marquée chez le lapin.
- Produits sanguins (la présence de protéase telles que trypsine, thrombine, thromboplastine…réagissent positivement avec le LAL en absence d'endotoxine.

Friberger et Coll.(1987) ont montré qu'une dilution au $1/10^{e}$ du plasma et une incubation à 70-80°C pendant 5 minutes détruit les protéases).

- Faible priorité :

- Préparations injectables aqueuses et non aqueuses, de 15ml administrées autrement que par voie intraveineuse et intrarachidienne
- Préparations auxquelles l'essai des pyrogènes sur lapin a été appliqué par difficulté comme essai de routine

Réactif :

- endotoxine standard de contrôle lyophilisé (CSE).
- Endotoxine standard de référence (RSE)
- Lysat lyophilisé en flacon de 5,2 ml à deux sensibilités: 0,06 EU/ml pour les eaux et 0,125EU/ml pour les poches.
- Alcool éthylique.
- Eau LAL (LRW) (eau pour essai des endotoxines bactériennes exempte d'endotoxines).
- Na OH qualité LAL à 0,1 mol/l

Appareillage et matériaux :

- Tubes de dilution en verre, 13 x 100 mm
- Tubes de réaction en verre, 10 x 75 mm
- Pipettes sérologiques sous emballage individuel de 10 ,100 ,1000 microlitres et apyrogènes
- Bloc chauffant ou bain-marie non-circulant à 37°C (±1°C)
- Chronomètre
- Vortex
- Support pour tubes à essai
- Microélectrode à pH
- Papier aluminium exempt d'endotoxines

Remarque : Veuillez utiliser des accessoires apyrogènes certifiés pour tests d'endotoxine.

B. Protocole :

- Reconstitution du lysat :

- Réaliser la reconstitution avec 5.2 ml d'eau LAL
- Mélanger délicatement avec des mouvements rotatoires pendant 30 secondes, en évitant la formation de mousse
- Distribuer le lysat reconstitué dans des tubes apyrogènes (10x75 mm) à raison de 0.1 ml
- Refermer chaque tube avec son bouchon ou bien avec des feuilles d'aluminium apyrogènes
- Noter la date de reconstitution et le numéro de lot ainsi que les initiales de l'analyse

- Conserver le flacon entre +2°C et +8°C après reconstitution pour utilisation immédiate pendant 24h
- Conserver à -10°C pendant 4 semaines

➢ Préparation d'hydroxyde de sodium 0,1 mol/l LAL :

- Utiliser pour la préparation d'hydroxyde de sodium en pastille (Na OH)
- Peser 19,99 g de Na OH en pastille
- En travaillant sous la hotte à flux d'air laminaire, mettre le contenu pesé dans le ballon de 500ml, augmenter le volume avec de l'eau LAL ; on obtient une solution de Na OH 1 mol/l
- Diluer au 1/10 : mettre 25 ml de Na OH 1 mol/l dans un ballon de 250 ml et augmenter le volume à 250 avec de l'eau LAL on obtient une solution de Na OH à 0,1 mol/l
- Stériliser la solution de Na OH à 0,1 mol/l pendant 1 heure à 121°C
- Conserver au réfrigérateur

➢ Reconstitution de l'endotoxine standard de contrôle (CSE) :

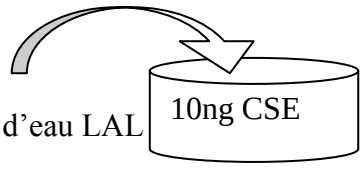
- L'endotoxine est reconstituée avec 5 ml d'eau LAL
- Agiter au vortex pendant 10 mn
- Noter la date de reconstitution et le numéro de lot
- L'endotoxine reconstituée peut être conservée dans son flacon d'origine pendant un mois entre +2°C et +8°C
- Avant chaque utilisation, il faut l'agiter au vortex pendant 60 secondes, puis 30 secondes à partir de la 2ème utilisation.

- Réalisation de la solution à 20ʎ :

Pour la réalisation des surcharges ; ajouter 10 µl d'une solution d'endotoxine à 20ʎ de manière à obtenir une surcharge à +2ʎ, et cela dépend du ratio de l'endotoxine utilisée :

- Le ratio est de 10 EU /ng
- ʎ=0,125 EU/ml ⟷ 20ʎ= 2,5 EU/ml

D'abord :



Flacon de CSE

Ensuite : 10 ng/flacon CSE ÷ 5ml d'eau LAL → 2 ng/ ml X ratio (10 EU/ng)= 20 EU/ ml

Enfin : 20 EU/ ml ʎ → 2,5 EU/ml (=20ʎ)

1/8

Donc : 100 µl d'endotoxines + 700 µl d'eau LAL

- ʎ= 0,06 EU/ml ⟷ 20ʎ= 1,25 EU/ml

Procéder de la même manière pour la sensibilité 0,06 EU/ ml

20 EU/ ml ʎ → 1,25 EU/ ml (=20ʎ)

1/16

Donc : 100 µl d'endotoxines + 1500 µl d'eau LAL

- Essai de routine :
  - Le produit est testé à la dilution définit lors de l'essai de caractérisation : pour l'eau osmosée, distillée, Na Cl 0.9%, Glucose 5% et 10% la concentration limite en endotoxine (ELC) est de 0.250 EU/ml donc la dilution maximal valide (MVD) est de 2 pour une sensibilité de lysat de 0.125 EU/ml et elle est de 4 pour une sensibilité de 0.06 EU/ml

  - Chaque dosage d'échantillon devra comporter :
    - 1 tube contrôle négatif : Eau LAL
    - 1 tube contrôle positif : Eau LAL + Endotoxine 20λ
    - 2 tubes contrôle produit positif : Echantillon + Endotoxine 20λ
    - 2 tubes dosage produit: Echantillon

Comme décrit dans le tableau ci-dessous

- Un résultat est considéré positif, s'il y'a formation d'un gel solide et qui ne se casse pas à inversion de 180°
- Un résultat est considéré négatif s'il y'a absence de gélification.

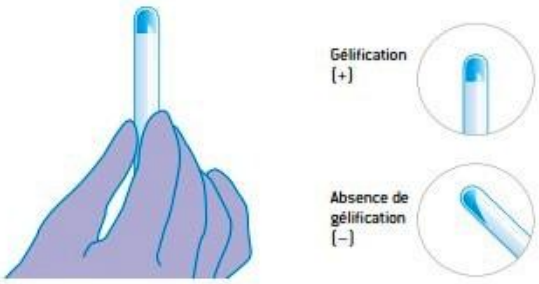


Figure 8: l'absence et la présence de gélification

Tableau 5: Mode de distribution des réactifs de test LAL (par gélification) :

Tube 0,1 ml lysat	Eau LAL	Echantillon à la dilution choisie	Endotoxine 20 ʎ
Contrôle négatif	0,1ml	-	-
Contrôle positif (2ʎ dans l'eau LAL)	0,1ml	-	10µl
Dosage 1	-	0,1 ml	-
Dosage 2	-	0,1 ml	-
Contrôle produit positif 1	-	0,1 ml	10µl
Contrôle produit positif 2	-	0,1 ml	10µl

C. Les résultats de l'essai LAL avec les interprétations :

Tableau 6 : les résultats de l'essai LAL avec les interprétations

Essai	Résultats	Interprétations
Un tube contrôle témoin négatif : eau LAL + Lysat	Absence de gélification	Vérification du non contamination
Un tube contrôle témoin positif : eau LAL + surcharge 2ʎ + Lysat	Formation d'un gel	vérification des conditions opératoire du test
Deux tubes contrôle positif produit : produit dilué + surcharge 2ʎ + lysat	Formation d'un gel	Vérification de la non-inhibition du test par le produit
Deux tubes contrôlent produit : produit dilué + lysat	Absence de gélification dans les deux tubes	Le produit contient moins nʎ endotoxines : produit accepté
	Absence de gélification dans un tube et formation d'un gel dans l'autre	• erreur de manipulation, refaire l'essai une deuxième fois • si ça persiste, refaire l'essai à la MVD : produit non accepté si les deux tubes ou l'un d'eux présentent une gélification
	Formation d'un gel dans les deux tubes	Refaire l'essai à la MVD : • si la gélification dans les deux tubes est positive : l'ELC est dépassée : produit non accepté • si la gélification dans les deux tubes est négative :l'ELC n'est pas dépassée : produit accepté refaire l'essai avec des dilutions aux ½ successives inferieures à la MVD pour connaitre l'intervalle de concentration d'endotoxines qui est : ʎ n/2 → nʎ *n/2 est le facteur de dilution du premier tube donnant réaction négative *n est le facteur de dilution du premier tube donnant réaction positive • absence de gélification dans un tube et présence dans l'autre : refaire l'essai à la MVD : produit non accepté si les deux tubes ou l'un d'eux présentent une gélification

2.2.5.2. contrôle L.A.L test

2.2.5.2.1. but : cette instruction à pour but d'assurer la qualité des résultats de l'essai des endotoxines bactériennes

2.2.5.2.2. domaine d'application :cette instruction est applicable sur les nouveaux lots de lysat et de matières premières entrant dans la fabrication des solutés massifs

Remarque:

- Les échantillons à tester peuvent être stockés entre 2-8°C pendant 24h
- Les échantillons stockés pendant plus de 24h peuvent être congelés

2.2.5.2.3. Qualification initiale :

- Préparer la gamme d'endotoxines dans l'eau à des concentrations de 2ʎ, ʎ, ʎ/2, ʎ/4
- Réaliser 4 séries à 2ʎ, ʎ, ʎ/2, ʎ/4
- Mélanger 100 µl de chaque dilution à 100 µl de lysat
- Vérifier le pH du mélange Lysat-Endotoxines dans l'eau (6-8) (pH près du pH isométrique des enzymes)
- Incuber les tubes au bain à sec à 37°C pendant une heure ±2 minutes en évitant toute vibration
- Lecture : la réaction est positive s'il y'a formation d'un gel qui ne se casse pas en faisant pivoter le tube de 180° d'un seul mouvement. Dans le cas contraire, le résultat est négatif
- Calculer la moyenne géométrique (MG) des logarithmes points finaux (la concentration la plus faible qui donne un résultat positif= **point final**, puis l'anti log MG=**sensibilité expérimentale ʎ.exp**)
- Si 0,5ʎ ≤ ʎ.exp ≤2ʎ, le laboratoire est qualifié pour la technique, vis-à-vis des lots de lysat et d'endotoxine et d'eau LAL.(Pour les dosages ultérieurs réalisés avec le même lot de lysat c'est la sensibilité du fabricant qui devra être utilisée et non celle déterminée expérimentalement.

2.2.5.2.4. Caractérisation de l'échantillon :

Il consiste à démontrer que l'échantillon n'est ni inhibiteur ni activateur à la dilution employée dans le dosage.

A. pH du mélange lysat-solution :

Réaliser des dilutions jusqu'au MVD et MVD/2 des solutions de soluté massif (SM) avec de l'eau LAL

- Mélanger 100µl de chaque dilution à 100µl de lysat
- Ajuster le pH de la solution à examiner ou de la dilution utilisée si nécessaire, avec de l'acide chlorhydrique 0,1 mol/l LAL ou l'hydroxyde de sodium 0,1 mol/l LAL. De telle sorte que le mélange de la solution et du lysat ait un pH compris entre 6-8

B. Essai préliminaire :

- Trouver une dilution du produit au moins inferieure ou égale à la MVD (dilution maximale valide)
- Pour cela faire le calcul de la MVD : MVD= $\frac{ELC}{\lambda}$

ELC= la concentration limite en endotoxines : CLE= $\frac{K}{M/C}$

M = dose maximale recommandée pour le produit, par kilogramme de masse corporelle et par heure

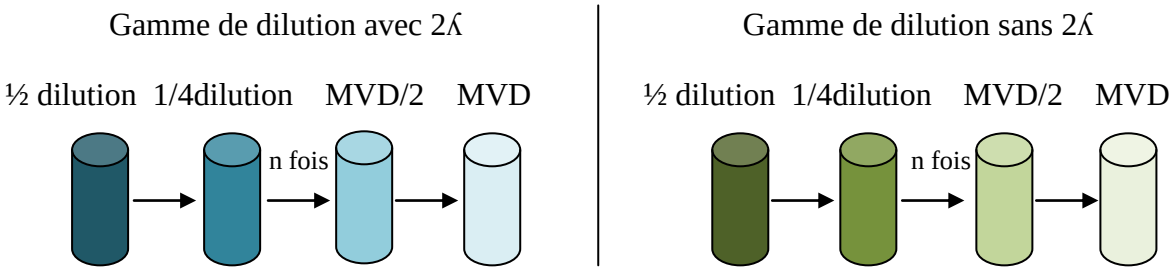
K = dose seuil d'endotoxine ayant un effet pyrogène, par kilogramme de masse corporelle et par heure.

K= 5,0 EU/Kg par voie parentérale

C =concentration en mg/ml

ʎ = sensibilité déclaré du Lysat

A cet effet :



- Comparer les résultats des deux séries : les cas rencontrés :

Tableau 7: comparaison des résultats des deux séries de dilution de l'essai préliminaire

Cas observés	résultats	Conclusions
- Les premiers tubes avec 2ʎ - Les derniers tubes avec 2ʎ	- négatif - positif	Erreur de manipulation
-Tous les tubes avec 2ʎ -Tous les tubes sans 2ʎ	- positif - négatif	Le produit n'est pas inhibiteur et contient moins d'endotoxines
-Tous les tubes avec 2ʎ et les tubes sans 2ʎ	- positif	Le produit renferme les endotoxines et n'est pas inhibiteur, ou le produit est activateur
-Tous les tubes des deux séries	- négatif	Présence d'éléments inhibiteurs que la MVD n'a pas éliminés

C. Essai de confirmation :

- Démontrer que la dilution non inhibitrice retenue est non activatrice de la réaction

A cet effet :

- Calculer pour chaque gamme la moyenne géométrique MG des 4 log 10 des gels point finaux

Tableau 8 : les calcules de la moyenne géométrique des deux gammes de dilutions

Séries	Gamme d'endotoxines dans le produit à la dilution retenue					Gamme d'endotoxines dans l'eau LAL				
	4ʎ	2ʎ	ʎ	ʎ/2	ʎ/4	4ʎ	2ʎ	ʎ	ʎ/2	ʎ/4
1										
2										
3										
4										

- Calculer le rapport : $C = \frac{antilog\ MG\ ʎ\ eau}{antilog\ MG\ ʎ\ produit}$

✓ C >2 : produit activateur

✓ C< 0,2 : produit inhibiteur

✓ 0 ,2 ≤C≤2 : produit ni activateur ni inhibiteur

- La dilution retenue doit : être ≤MVD et la première dilution non inhibitrice
- Si à la dilution étudiée une interaction est visible ; refaire l'essai de caractérisation sur une dilution plus grande ; sans dépasser la MVD
- Si la MVD n'est plus possible(atteindre la limite du dilution), il faut employer un lysat plus sensible afin d'augmenter la MVD

  NB : la durée de conservation des informations de la qualification initiale et vérification de la sensibilité du lysat (gamme d'endotoxine dans l'eau) est 1 année

2.2.5.3. Conclusion :

Nous avons effectué le test LAL par la méthode de gélification qui était plus sensible, d'exécution facile et de moindre coût. Cette méthode repose sur la propriété que possède le lysat d'entraîner la formation d'un gel solide lorsqu'il est mélangé avec une solution contenant des endotoxines bactériennes.

A l'issue de la présente étude, nous pouvons dire que la méthode par gélification est valide.

3.Discussion :

Les endotoxines issues des bactéries à Gram négatif sont les principales responsables des effets toxiques attribués à la contamination des médicaments par des pyrogènes. Leur activité pyrogène est beaucoup plus élevée que celle de la plupart des autres substances pyrogènes.

Les principales réactions suite à l'injection d'endotoxines sont une hyperthermie et des réactions vasculaires de type hypotension et coagulation intra vasculaire disséminée (CIVD).

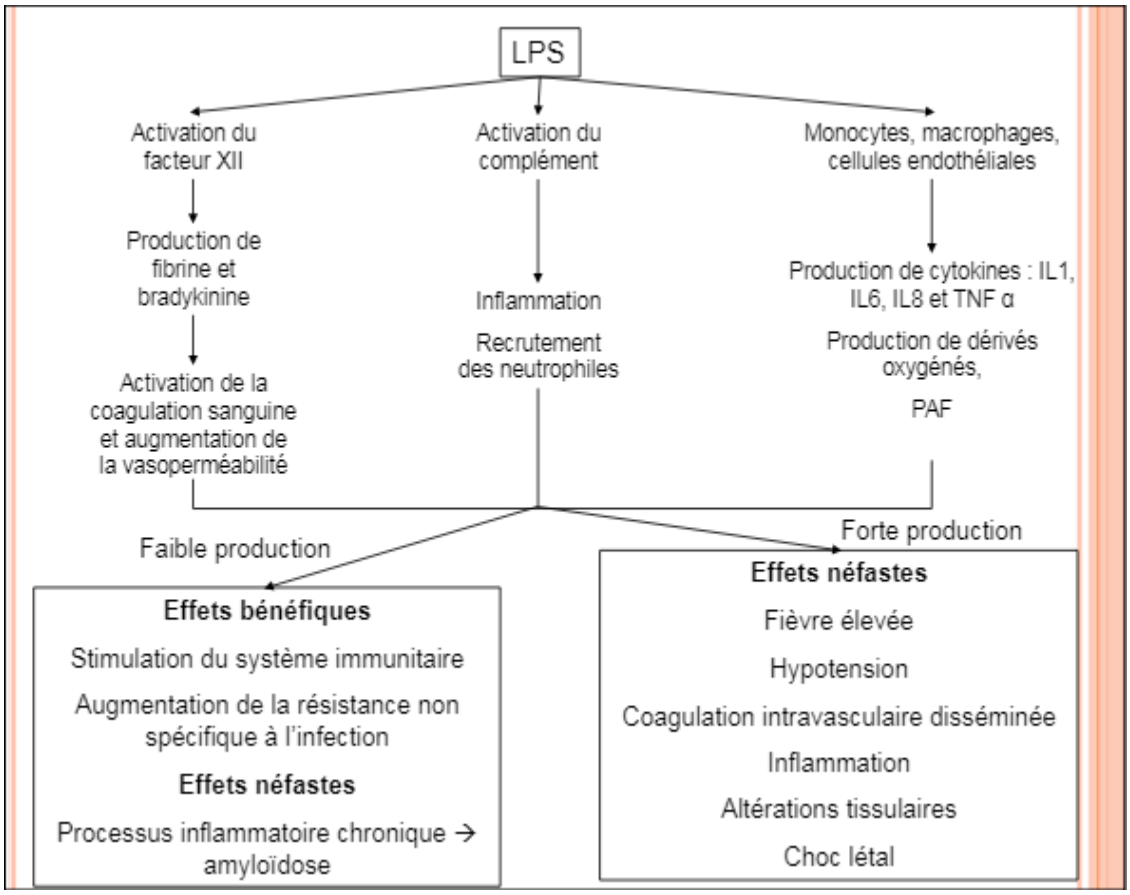


Figure 9: Les principales réactions provoquer par l'injection d'endotoxine

Il faut préciser aussi que l'homme est plus sensible que le lapin aux substances pyrogènes, et notamment à l'injection d'endotoxines**. (MicroCSB, 2014)**

Donc il est important de les détecter dans les préparations pour usage parentéral et les dispositifs médicaux.

Tout au long de cette étude nous avons travaillé avec le sérum physiologique glucosé de SAIDAL.

La recherche des pyrogènes a été rendue obligatoire pour la première fois aux Etats-Unis en 1942 par la Pharmacopée américaine ; la France et de nombreux autres pays ont suivi après.

Après avoir décrit le mécanisme d'action des pyrogènes, nous avons relevé les différentes méthodes de détection actuellement en œuvre.

Deux tests se dégagent de l'ensemble : l'essai sur lapins et le test du Limulus ou LAL. Le premier est un test in vivo, tandis que le second est un test in vitro.

3.1. Choix de la méthode :

Dans cette étude nous avons utilisé un test in vitro (méthode LAL),et un test in vivo (test Lapin).

BLECHOVA et PIVODOVA ont fait une étude comparative de la méthode LAL et du test pyrogène chez le lapin.

La comparaison entre les deux tests est basée sur la recherche des avantages et des inconvénients de chaque test.

3.1.1. Les tests in vivo : (test sur lapins)

A. Avantage :

- Ils sont beaucoup plus proches de la clinique
- L'interprétation des résultats est parfois plus facile car le rapport avec la clinique est souvent plus évident
- Un matériau peut en effet se révéler biocompatible alors que ses produits de dégradation, une fois métabolisés par l'organisme se révèlent être dangereux, donc :
    - Ils permettent d'évaluer la toxicité des métabolites
    - Ils permettent d'évaluer les effets d'un matériau sur des organes loin de l'organe cible
- détecte des substances hyperthermisantes qui pourraient ne pas être des endotoxines.

B. Inconvénients :

- La répétition du test entraîne l'utilisation d'un nombre important d'animaux ;
- Les pyrogènes sont immunisants, les animaux deviennent résistants après des injections répétées.
- Les animaux n'ont pas subit d'anesthésie car celle-ci aurait entrainé une baisse de température
- L'effet néfaste peut passer inaperçu s'il est non recherché donc non évalué
- Il peut être difficile de simuler la pathologie préexistante
- De nombreux lapins sont morts à cause de ce test
- Le test de pyrogénicité sur le lapin prend beaucoup de temps
- Timing incorrect de l'essai (l'effet délétère se manifeste après les périodes d'observation) l'évaluation et l'interprétation des résultats peuvent être difficiles
- Animalerie importante ; où les lapins exige des conditions de : nourriture, d'hygiène, de température, d'hygrométrie stricte, et la nécessité d'un laboratoire équipé de table de contention, d'appareil de mesure de température anale

- La température du lapin varie d'un animale à l'autre et même dans le temps pour un même animale dans le cas de chocs, de mauvaise contention ou d'excitation. De plus, le stress inévitable de tous les animaux de laboratoire et qui se manifeste par des variations de pouls, de la tension, du niveau hormonal, des activités immunologiques et de beaucoup d'autres fonctions dans tout l'organisme.
  En fait, la plupart des découvertes effectuées en laboratoire ne font que refléter les mauvaises conditions des laboratoires.
- La sensibilité insuffisante des lapins pour la détection de la présence d'endotoxines, spécialement dans les produits en intraveineuse, dans l'eau pour les bébés et dans les produits ayant une concentration limite en endotoxines (ELC) basse
- Le personnel responsable du test doit être très expérimenté afin d'éviter les faux positifs mais surtout les faux négatifs
- Les tests réalisés sur les animaux de laboratoire peuvent ne pas avoir de rapport avec l'espèce humaine
- Le test de pyrogénicité chez le lapin ne signifie pas une sécurité pour l'homme-ce n'est pas parce qu'un lapin n'as pas de fièvre qu'on peut conclure qu'une substance est exempte de pyrogène
- Contrairement à l'examen clinique sur les humains, l'expérimentation animal inclut la manipulation de conditions induite de façon artificielle
- Les tests avec les animaux sont à éviter pour des raisons d'éthique et en accord avec la « règle des 3 R » (raffinage, réduction, remplacement)
- Pour des raisons de sécurité il faut au moins deux manipulateurs ;

3.1.2. Les tests in vitro : (test L.A.L méthode par gélification)

A. Avantage :

- Les tests in vitro permettent d'évaluer séparément les effets biologiques de chacun des composants, du matériau
- La fiabilité des réactifs (un contrôle positif, contrôle négatif de la réaction sont pratiqués parallèlement au test)
- Plus sensible que le test des lapins (15 à 20 fois supérieure à celle de l'essai sur lapins. Le LAL détecte 5.10^{-5} ng/ml d'endotoxine.)
- Le faible volume de produit à contrôler
- Moins onéreux
- Reproductibles
- Plus rapides que les tests in vivo(en 1h et 30min)
- Un seul manipulateur peut mener à bien le test
- Plusieurs échantillons peuvent être testés le même jour ;

B. Inconvénients :

- Il ne peut détecter que les pyrogènes provenant des Gram (-)

- Ils sont trop sensibles (La moindre interférence peut influer sur le résultat du test :
  Les interférences sont dues à la haute sensibilité du lysat.

D'après GREFF-MIRGUET les nombreuses causes d'interférences sont :

- La température d'incubation : elle doit rester comprise entre 36 et 38°C ; la sensibilité du test est quasi nulle à 25°C. Le LAL est détruit à une température supérieure à 45°C
- Les conditions de pH : pour l'utilisation du LAL les conditions optimales de pH sont comprises entre un pH égal à 6,4 et un pH égal à 8 ; en dehors de cette fourchette, la sensibilité du LAL est altérée.
- Adsorption des endotoxines sur le matériel du laboratoire
- La présence de certains cations
- La modification de l'enzyme ou de la protéine coagulase
- L'activation du LAL
- Les conséquences de la stérilisation

La façon la plus courante de lever ces interférences (inhibitions et activations) est la dilution dans l'eau. Mais il existe d'autres moyens courants :

- Les dilutions en tampon pH 7 ou ajustement de pH ;
- Les ajouts de cations divalents : sels de Mg ou Ca ;
- Le chauffage à 60°C pendant dix minutes pour certains dérivés protéinés
- L'ultrafiltration.

- Ils n'ont que peu de rapport avec la clinique
- Bien que le réactif LAL signifie moins de souffrance animale et des résultats plus pertinents, les résultats ne sont pas transposables sur l'homme du fait de l'emploi de sang animal

Après cette étude comparative BLECHOVA et PIVODOVA ont conclue que l'essai des pyrogènes chez le lapin avait beaucoup de désavantages, et que le coût était particulièrement élevé par rapport au test LAL qui était plus sensible, plus précis, d'exécution facile et de moindre coût.

D'après la Pharmacopée Européenne l'essai des endotoxines bactériennes peut être réalisé par trois techniques : gélification (induction de la formation d'un gel), turbidimétrie (développement d'une turbidité par clivage d'un substrat endogène), colorimétrie (développement d'une coloration par clivage d'un complexe peptido-chromogène synthétique).

Les auteurs JOINER, KRAUS et KUPIEC écrivent que la méthode par gélification est la plus précise et la plus sensible des procédures de recherche d'endotoxines dans les préparations injectables parce qu'on obtient dans les résultats moins de faux-négatif et faux-positif.

3.2.De point de vue critique :

La Commission européenne soutient résolument les applications destinées à limiter, remplacer et affiner l'expérimentation animale comme le prévoit la directive du Conseil de 1986.

Cet objectif est repris par la pharmacopée européenne. Le concept des « Three R » est à la base d'une stratégie visant à limiter l'utilisation des animaux sans compromettre la qualité des travaux scientifiques effectués.

Des LAPINS ou des LIMULES ?

Le test d'apyrogénicité sur les lapins a certes permis de contrôler l'innocuité des médicaments pendant plus de 50 ans, mais elle n'est plus adaptée aux importantes thérapies nouvelles comme celles faisant intervenir des produits cellulaires ou des agents spécifiques aux espèces.

Les limules ont connu l'âge de glace, l'asphyxie au carbone, les chutes d'astéroïdes, l'extinction des dinosaures... Et ont survécu. Mais les hommes pourraient aujourd'hui causer la perte de ce fossile vivant...

Le nombre d'animaux récoltés pour l'industrie biomédicale a ainsi bondi de 86% depuis 2004, pour atteindre 545,973 animaux prélevés en 2013. Aucune restriction n'a été établie sur le nombre d'animaux récoltés, puisque les scientifiques les relâchent dans l'océan après avoir prélevé 30% de leur sang. **(Science et avenir, 2016)**

Mais des chercheurs ont découvert un taux significatif de mortalité après la remise à l'eau. En 2015, dans l'étude Changing Global Perspectives on HorseshoeCrabBiology, le scientifique Thomas Novitsky écrivait : *« la mortalité des limules saignées (après avoir été relâchées) est plus élevée qu'on ne le pensait (29% contre 15%). Les femelles peuvent avoir une capacité réduite pour cicatriser ; et les crabes saignés deviennent désorientés et affaiblis »*.

Les femelles peuvent également avoir des difficultés à se reproduire et pondre de nouveau. D'après John Dubczak, directeur des opérations aux laboratoires Charles River à Charleston, 4% des limules capturées meurent avant d'être relâchées. Mais certains écologistes américains estiment à plus de 30% le taux de mortalité en laboratoire.

4. En concluant :

On ne peut pas tester simultanément un groupe important de Lapin et en peut dire que la recherche des pyrogènes sur Lapin prend beaucoup de temps par rapport au test LAL qui estplus sensible, d'exécution facile et de moindre coût. Il repose sur la propriété que possède le lysat d'entraîner la formation d'un gel solide lorsqu'il est mélangé avec une solution contenant des endotoxines bactériennes.

Doncsi on veut continuer à soigner l'Homme – et l'animal–, on ne peut s'en passer. Mais en tenir compte du bien-être animal et de développer des solutions substitutives solides.

5. Recommandation :

La science dispose toujours de plusieurs voies pour traiter une question donnée :

Pourquoi l'expérimentation animale continue d'exister ?

Notre étude avait pour but de trouver une méthode qui assure la non utilisation de l'animale, plus exactement d'annuler l'utilisation du Lapin dans la recherche des pyrogènes,

Donc on a choisi le test LAL qui est le résultat d'extraction du sang d'un autre animale que le Lapin qui est un crabe.

Alors on est trouvé dans un cercle vicieux

Comme on a essayée de chercher une alternative pour le test sur lapin donc on est obliger de substituer cette extraction du sang bleu de Limule :

Est-ce que c'est possible de faire une synthèse du sang de ce crabe en fer à cheval sans aller vers l'extraction ?

5.1.Des cellules sanguines humaines!

Cinq méthodes d'essais cellulaires de substitution in vitro ont été évalués par ICCVAM en réponse à une soumission par le Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (maintenant connu comme EURL ECVAM) pour remplacer l'essai d'apyrogénicité sur le lapin et combler les lacunes présentées par l'essai LAL du point de vue du contrôle de l'innocuité des médicaments parentéraux.

- L'humain Sang / IL-1 *in vitro* des pyrogènes Test (WB / IL-1)
- L'humain Sang / IL-1 *in vitro* des pyrogènes de test en utilisant cryoconservés humain de sang total (cryo WB / IL-1)
- L'humain Sang / IL-6 *In Vitro* pyrogènes Test (WB / IL-6)
- *In Vitro* pyrogènes Essai de PBMC humaines (CMSP / IL-6)
- Une alternative *in vitro* des pyrogènes de test en utilisant le monocytoïdesHumanCell Line MONO MAC 6 (MM6 / IL-6)

Toutes ces méthodes d'essai reposent sur la réaction des leucocytes humains (principalement les monocytes), qui produisent des médiateurs de l'inflammation (pyrogènes endogènes) en réponse à une contamination par des pyrogènes (pyrogènes exogènes).

La libération de cytokines accrue est utilisée comme marqueur biologique d'une réaction pyrogène. La fiabilité et la pertinence de chaque méthode d'essai a été évaluée avec des produits pharmaceutiques parentérales apyrogènes ensemencés avec différentes concentrations d'une norme d'endotoxine.

En utilisant un modèle de prévision élaboré sur la base *in vivo* des données de lapin, les résultats de chaque méthode d'essai ont été comparés à l'état vrai des échantillons.

Les nouveaux essais offrent plusieurs avantages par rapport à l'essai sur le lapin: ils sont moins laborieux, moins chers et plus sensibles. Et les résultats de l'étude de validation suggèrent qu'ils pourront remplacer totalement les essais sur les animaux.

Par rapport à l'essai LAL, les nouveaux essais ne se limitent pas aux endotoxines des bactéries à Gram négatif, mais détectent tous les types de pyrogènes et traduisent l'activité des différentes endotoxines chez les mammifères sans subir d'interférence des composants liés aux endotoxines dans les produits sanguins.

Une version commerciale de l'un des essais a déjà été mise au point et normalisée, et un essai utilisant comme réactif du sang pré-testé et soumis à cryoconservation (congelé), contenant les cellules sanguines comme biocapteurs, est en cours d'élaboration.

- ***PyroDetect***

Dans cette méthode, du sang humain provenant de dons du sang est utilisée, la substance testée est ajoutée au sang et maintenue à la température normale du corps humain.

Si la substance testée est souillée par des pyrogènes, il se forme – comme ce serait aussi le cas dans le corps humain en raison du système immunitaire – des anticorps et substances messagères qui peuvent être détectées de manière tout à fait univoque.**(CAAVS, 2012)**

- Grâce à l'emploi de sang humain, les résultats de pyroDetect sont très pertinents pour l'homme.
- pyroDetect est beaucoup plus sensible que le test de pyrogénicité chez le lapin et peut révéler une largeur de bande plus grande de pyrogènes.
- cette méthode est beaucoup plus rapide, plus avantageuse et de loin plus fiable que les deux autres.

CONCLUSION

Des méthodes substitutives existent, mais aucune loi ne contraint à les appliquer, et si l'expérimentation animale présente autant de défauts, pourquoi continue-t-elle d'être pratiquée? Plusieurs explications sont possibles.

- Pour les industries chimiques et pharmaceutiques, l'expérimentation animale constitue un refuge juridique important, peut facilement être publiée, se perpétue et est lucrative.
- La moralité de l'expérimentation animale est rarement remise en question par les chercheurs, qui préfèrent défendre dogmatiquement la pratique plutôt que d'affronter les questions éthiques évidentes qu'elle génère.
- Les expériences sur les animaux semblent plus «scientifiques» que la recherche clinique.

La valeur de l'expérimentation animale est fortement exagérée par les milieux qui, pour des raisons purement économiques, ont intérêt à ce qu'elle soit maintenue.

L'expérimentation animale se concentrant sur des pathologies artificiellement créées et incluant des variables contradictoires et étant douteuse du fait des différences anatomiques, physiologiques et pathologiques entre les humains et les animaux, elle représente par sa nature une méthode peu valable pour l'examen des processus des maladies humaines.

Références Bibliographiques :

- **CAAVS, 2010 :** Communauté d'Action Antivivisectionnistes Suisses · Ligue nationale de l'antivivisection, Expériences sur animaux pour les produits cosmétiques, ménagers et de nettoyage.
- **CAAVS, 2012** : Communauté d'Action Antivivisectionnistes Suisses,Albatros : la médecine de l'avenir,Les possibilités de la recherche sans expériences sur animaux,
- **CAAVS, 2013:** Communauté d'Action Antivivisectionnistes Suisses : Questions et réponses sur le thème de l'expérimentation animale,
- **Catherine OIRY – CUQ. 2016:** Laboratoire de pharmacologie, UFR pharmacie L'expérimentation animale, Les méthodes alternatives à l'expérimentation animale
- **Céline BROCHOT, Enrico MOMBELLI, 2016:** FROCOPA, NEWSLETTER n°7: plate – forme national pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale, remplacement : la place des méthodes in silico.
- **Christopher Anderegg Dr méd., Dr phil., Kathy Archibald, B.Sc., Jarrod Bailey, Dr phil., Murry J. Cohen, Dr méd., Stephen R. Kaufman, Dr méd., John J. Pippin, Dr méd., F.A.C.C. 2006 : Comité pour la modernisation de la recherche médicale** *[MedicalResearchModernizationCommitee]* **;un regard critique sur l'expérimentation animale «** *A Critical Look at Animal Experimentation* »**; pages 41**
- **Comité d'éthique. 2002 :** Chartepour une éthique de l'expérimentation animale**,** La douleur de l'animale au cours d'une expérimentation
- **Commission Européenne, 2013 :** Rapport de la commission au conseil et au parlement européen. Septième 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 ; Bruxelles, le 5.12.2013 COM(2013) 859 final ; pages 15
- **Dr Catherine VOGT, 2016 :** FROCOPA, NEWSLETTER n°7: plate – forme national pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale, EXEMPLE DE méthode alternative en enseignement et formation ou l'enseignement de la chirurgie sans mal et sans animal
- **Fanny Demay, 2016:** BTS BioAnalyses& Contrôles, Le Test de Limulus
- **Françoise Dupuy Maury, 2016 :** Grand Angle, Recherche animale Pourquoi est-elle encore essentielle ? ©Westend 61 / Gmbh/alamy science et santé n° 30
- ***G.* Greff-Mirguet, 2002 :** cahier de notes documentaire- hygiene et sécurité du travail – N°187, 2e trimestre 2002,échantillonage et analyse des endotoxines dans l'air, etude bibliographique, département métrologie des polluants, centre de lorraine, INRS ND 2170-187-02
- **GIS, 2012 :** Groupement d 'Interet Scientifique F R A N C O P A, Plateforme française pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale, rapport a madame la ministre de l'enseignement supérieure et de la recherche, état des lieux des méthodes alternatives dans le domaine de l'expérimentation animale France, pages 177
- **Journal officiel de l'Union européenne, 2010 :** commission européenne, Respecter les animaux pour la science de demain, directive 2010/63/EU Sur la protection des animaux utilisé à des fins scientifique, pages 158

- **Laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques, 2000 :** république algérienne démocratique et populaire, ministère de la santé et de la population, techniques de contrôle pharmacotoxicologique des produits pharmaceutiques.
- **Laure Déléry, 2007 :** Rapport d'étude, endotoxines, élément disponible pour une évaluation des risques sanitaires en lien avec les émissions des installations classées pour la protection de l'environnement,DRC-07-76413-00350A
- **Le conseil fédéral suisse. 2005 :** Loi fédérale sur la protection des animaux, *L'Assemblée fédérale de la Confédération suisse,*
- **MicroCSB, 2014 :** INTRODUCTION – microcsb,*microcsb.net/IMG/pdf/doc-57.pdf*
- **OIE, 2013 :**Organisation Mondiale de la Santé Animale, Protéger les animaux, préserver notre avenir, code sanitaire pour les animaux terrestre, volume 1, disposition générale, Vingt-deuxième édition, 2013, ISBN 978-92-9044-911-9
- **Sophie Emmanuelle PICAVET, 2004 :** Pratique de l'éthique en toxicologie reglementaire : rédaction d'une procédure fixant des points limites. THESE Pour le diplôme d'Etat de DOCTEUR VETERINAIRE, Ecole National Vétérinaire de Nantes

WEBGRAPHIE :

- **Centre didactiquebiotech, 2013 :** 1. Expérimentation animale: le dilemme | Interpharma Centre didactique en biotechnologie, http://biotechlerncenter.interpharma.ch/fr/3086-1-experimentation-animale-le-dilemme
- **Compagne pour l'abolition de la vivisection, 2013 :** Destination Enfer - Les chiffres de 2013 de la vivisection, http://www.destination-enfer.com/chiffres-vivisection-europe-2013.html
- **Djexreveur. Daniel JAGLINE, 2010 :** Expérimentation animale : s'en passer doit être le seul objectif ! , http://danieljaglinedjexreveur.over-blog.com/article-experimentation-animale-s-en-passer-doit-etre-le-seul-objectif-53470996.html
- **Jaouida Ben Aouali, 2016 :**PharmInfo, webmaster, Interférences dans les tests LAL, https://pharminfo.pro/interferences-tests-lysat-amoebocytes-limule/
- **LSCV 2012 :** Ligue suisse contre la vivisection, Statistiques des expériences sur les animaux en Suisse en 2011, http://www.lscv.ch/pages/experimentations/experimentation/statistiques/statistiques_2011.html
- **OPAL, 2015 : Recherche** expérimentale et protection de l'animal de laboratoire**,** OPAL - FRANCOPA 2015 – ASIEM, http://www.alphavisa.com/opal/2015/
- **Recherche animal. 2013 :** La réglementation | Recherche animale, https://www.recherche-animale.org/decouvrir-la-recherche-animale/la-reglementation
- **Science et avenir, 2016 :**Le limule : un animal vieux de 450 millions d'années menacé d'extinction, https://www.sciencesetavenir.fr/animaux/animaux-marins/la-limule-un-animal-vieux-de-450-millions-d-annees-menace-d-extinction_103167

Résumé

L’expérimentation animale consiste à utiliser des animaux comme substitut ou « modèle », pour mieux comprendre la physiologie d'un organisme et ses réponses et tout particulièrement pour tenter de prévoir ce qui se passe chez l'Homme. Et en respectant le bien-être animal, Russell et Burch en 1959 introduit le principe des 3R qui résume l’objectif des méthodes substitutives.

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 notre étude de contrôle d’apyrogénicité des solutions injectable; 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.

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.

Enfin, Les nouveaux modèles biologiques ainsi que les outils d’analyse plus performants, physico-chimiques, exploratoires ou de criblage à haut débit couplé à la bio informatique en citant : in silico, in vitro, des modelés animales en PVC ou même des bio puces offrent des perspectives alternatives prometteuses.

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

summary

Animal experimentation involves using animals as a substitute or "model" to better understand the physiology of an organism and its responses, and in particular to try to predict what happens in humans. And in respect of animal welfare, Russell and Burch in 1959 introduces the 3R principle which summarizes the purpose of substitute methods

The European Pharmacopoeia has published or modified numerous monographs proposing the abolition of methods which are no longer necessary because of the implementation of Good Laboratory Practice (GLP), Good Manufacturing Practice (GMP) and Quality Assurance), For example in our study of apyrogenicity control of injectable solutions; It proposes novel in vitro methods, such as the Limulus Amebocyte Lysate test to replace the apyrogenicity test in rabbits or strategies to reduce both the number of animals used and the suffering imposed.

A method that must replace a regulatory method using the animal must be scientifically validated and must be approved by the regulatory authorities before being used.

Finally, the new biological models as well as the more powerful, physicochemical, exploratory or high-throughput screening tools coupled with bioinformatics, mentioning in silico, in vitro, animal models in PVC or even bio Chips offer promising alternatives.

Keywords: substitution methods, animal testing, validation, regulation, quality control, 3R principle.

ملخص

التجارب على الحيوانات هو استخدام الحيوانات كبديل أو "نموذج" لفهم أفضل لعلم وظائف الأعضاء من كائن حي والأجوبة، وخصوصا لمحاولة التنبؤ بما يحدث تلخص هدف طرق بديلة Rفي البشر. واحترام الرفق بالحيوان، وعرض راسيل وبورتش في عام 1959 **مبدأ** 3

، ممارسات (GLP) وقد نشرت دستور الأدوية الأوروبي أو تحريرها العديد من الدراسات تقترح حذف أساليب الآن غير مجدية بسبب إدخال الخير مختبر الممارسة ، على سبيل المثال في دراستنا السيطرة مولد الحمى الحلول عن طريق الحقن. يقترح أساليب جديدة في المختبر، (QA) **وضمان الجودة** (GMP) التصنيع الجيدة المحللة خلية أميبية الشكل) لتحل محل اختبار مولد الحمى في الأرانب أو استراتيجيات للحد من عدد الحيوانات Limulus الليمول) Limulus مثل اختبار الليمول .المستخدمة ومعاناتهم المفروض

.في الواقع، وهي طريقة لاستبدال طريقة المحدد باستخدام الحيوانات يجب التحقق من صحة علميا ويجب أن تتم الموافقة من قبل السلطات التنظيمية قبل استخدامها

وأخيرا، فإن النماذج البيولوجية الجديدة وكذلك المزيد من أدوات التحليل، الفيزيائية والكيميائية والاستكشافية أو ارتفاع فحص الإنتاجية إلى جانب المعلوماتية .على شكل حيوان أو حتى الحيوي رقائق تقدم وجهات نظر بديلة واعدة PVCالحيوية مستشهدا: في سيليكون، في المختبر،

كلمات البحث: طرق بديلة، التجارب على الحيوانات، والمصادقة والتنظيمية، ومراقبة الجودة، RS3