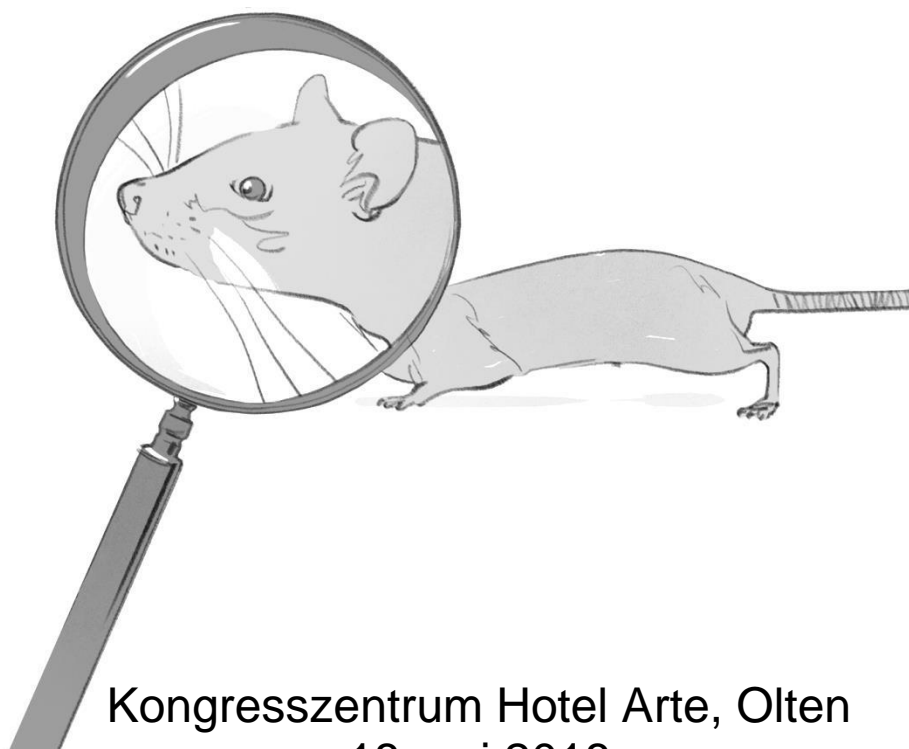




Exposés du 11<sup>e</sup> congrès sur l'expérimentation animale

# «Le centre de compétences 3R (3RCC) – amélioration de la recherche et diminution du nombre d'expériences sur les animaux?»



Kongresszentrum Hotel Arte, Olten  
18 mai 2018

**Les experts du 11<sup>e</sup> congrès de la PSA sur l'expérimentation animale  
«Le centre de compétences 3R (3RCC) – amélioration de la recherche et dimi-  
nution du nombre d'expériences sur les animaux?»  
Vendredi 18 mai 2018, Kongresszentrum Hotel Arte, Olten**

**Dr méd. vét. Kaspar Jörger**

Responsable Protection des animaux, Office fédéral de la sécurité alimentaire et des  
affaires vétérinaires OSAV, Berne  
[kaspar.joerger@blv.admin.ch](mailto:kaspar.joerger@blv.admin.ch)

**Dr Chantra Eskes**

Directrice 3RCC, Berne  
[chantra.eskes@secam-ce.eu](mailto:chantra.eskes@secam-ce.eu)

**Prof. Dr Monika Schäfer-Korting**

Institut de Pharmacie, Université libre de Berlin  
[monika.schaefer-korting@fu-berlin.de](mailto:monika.schaefer-korting@fu-berlin.de)

**Prof. Dr méd. Stefan Hippenstiel**

Clinique médicale, Charité – Université de médecine, Berlin  
[stefan.hippenstiel@charite.de](mailto:stefan.hippenstiel@charite.de)

**Prof. Dr méd. Horst Spielmann**

Institut de Pharmacie, Université libre de Berlin  
[horst.spielmann@fu-berlin.de](mailto:horst.spielmann@fu-berlin.de)

**Prof. Dr Gerhard Gstraunthaler**

Département de Physiologie, Université de médecine, Innsbruck  
[gerhard.gstraunthaler@gmail.com](mailto:gerhard.gstraunthaler@gmail.com)

**Prof. Dr Pierre Cosson**

Département de Physiologie Cellulaire et Métabolisme, Université de Genève  
[pierre.cosson@unige.ch](mailto:pierre.cosson@unige.ch)

**Prof. Dr Michael Raghunath**

Direction du Département spécialisé de biologie cellulaire et de génie tissulaire,  
Haute Ecole des Sciences appliquées ZHAW, Zurich  
[ragh@zhaw.ch](mailto:ragh@zhaw.ch)

**PD Dr rer. nat. Alexander S. Mosig**

Institut de biochimie, Clinique universitaire, Jena  
[alexander.mosig@med.uni-jena.de](mailto:alexander.mosig@med.uni-jena.de)

## Contenu

|  |    |
|--|----|
| Dr méd. vét. MLaw Julika Fitzi-Rathgen<br><b>Introduction</b> .....  | 4  |
| Dr méd. vét. Kaspar Jörger<br><b>Attentes de l'OSAV vis-à-vis du 3RCC</b> .....  | 5  |
| Dr Chantra Eskes<br><b>Le centre de compétences sur les 3R: favoriser la recherche et la formation dans les 3R</b> .....   | 7  |
| Prof. Dr Monika Schäfer-Korting<br><b>La plate-forme de recherche Berlin-Brandebourg BB3R – recherche et formation graduée depuis 2014</b> .....                       | 8  |
| Prof. Dr méd. Stefan Hippenstiel<br><b>Cultures cellulaires de poumons humains: un exemple de la recherche au nouveau centre de compétences 3R de la Charité</b> ..... | 9  |
| Prof. Dr méd. Horst Spielmann<br><b>Concept Tox21: toxicologie sans expérimentation animale</b> .....  | 11 |
| Prof. Dr Gerhard Gstraunthaler<br><b>A la recherche d'alternatives au sérum de veau foetal – la lumière au bout du tunnel</b> .....                                    | 12 |
| Prof. Dr Pierre Cosson<br><b>Anticorps recombinants (recherche, production et implémentation)</b> .....  | 14 |
| Prof. Dr Michael Raghunath<br><b>The Scar in the Jar – un système in vitro pour tester les substances antifibrotiques</b> .....  | 15 |
| PD Dr rer. nat. Alexander S. Mosig<br><b>Systèmes microphysiologiques dans la recherche translationnelle – applications et perspectives</b> .....                      | 17 |

Dr Julika Fitzi-Rathgen, méd. vét. MLaw  
Service expérimentation animale, responsable du congrès

### **PROTECTION SUISSE DES ANIMAUX PSA**

Dornacherstrasse 101  
Case Postale 151  
4018 Bâle

Tél. 061 365 99 99  
Fax 061 365 99 90

[www.protection-animaux.com](http://www.protection-animaux.com)  
[psa@protection-animaux.com](mailto:psa@protection-animaux.com)

## Introduction

Dr Julika Fitz-Rathgen, méd. vét. MLaw, Service expérimentation animale et génie génétique, Protection Suisse des Animaux PSA, à l'occasion du 11<sup>e</sup> congrès spécialisé PSA sur l'expérimentation animale «Le centre de compétences 3R (3RCC) – amélioration de la recherche et diminution du nombre d'expériences sur les animaux?» le 18 mai 2018, Olten

Le lancement du nouveau Centre de compétences 3R (3RCC) devrait permettre enfin d'imposer les principes 3R après plus de 20 ans, comme le législateur l'inscrivait en 1993 à l'art. 22 de la loi sur la protection des animaux: La Confédération encourage notamment, en collaboration avec les hautes écoles et l'industrie, le développement, la reconnaissance et l'application de méthodes qui peuvent remplacer des expériences sur les animaux ou réduire soit le nombre des animaux utilisés, soit les contraintes qui leur sont imposées.

En dépit de l'indéniable potentiel économique et scientifique des méthodes de substitution, il n'est qu'à peine exploité en Suisse bien qu'elles soient plus avantageuses et plus rapides. Et c'est ce qui doit changer maintenant. L'utilisation des méthodes de substitution offre infiniment plus de possibilités aux niveaux scientifique et économique que l'expérimentation animale. Raison pour laquelle l'UE et les Etats-Unis investissent des ressources considérables dans le développement et la mise en œuvre de ces méthodes alternatives.

Ce nouveau centre de compétences va-t-il déclencher un net recul des expériences sur les animaux, voilà la question décisive pour les amis et protecteurs des animaux. De même, est-ce que l'industrie, les hautes écoles et les universités pourront être mises en réseau de manière à placer au premier plan les 3 R, notamment les méthodes de substitution, dans les activités de recherche? En effet, la recherche académique est appelée à s'engager davantage dans ce sens, car elle enregistre depuis quelques années une augmentation des expériences sur les animaux. Des intervenants compétents provenant de Suisse et d'autres pays nous permettront d'étudier ces aspects et d'autres encore vont nous être présentés.

## Attentes de l'OSAV vis-à-vis du 3RCC

Dr méd. vét. Kaspar Jörger, Responsable Protection des animaux, Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires OSAV, Berne à l'occasion du 11<sup>e</sup> congrès de la PSA sur l'expérimentation animale «Le centre de compétences 3R (3RCC) – amélioration de la recherche et diminution du nombre d'expériences sur les animaux?», 18 mai 2018, Olten

Les principes 3R<sup>1</sup> doivent être appliqués pour chaque expérience sur des animaux. En Suisse, les chercheurs sont obligés de réduire au minimum le nombre d'animaux pour les expériences. Quand elles existent, il faut recourir aux méthodes de substitution. Les expériences absolument indispensables doivent être réalisées avec autant de ménagement que possible.

Tous les acteurs, les chercheurs, les promoteurs de la recherche, l'industrie pharmaceutique et les autorités travaillent ensemble pour remplacer les expériences sur les animaux et développer des expériences moins pénibles. Afin de renforcer la mise en œuvre des principes 3R, le Conseil fédéral a recommandé la création d'un centre national de compétences 3R<sup>2</sup>.

Suite à plusieurs ateliers, la Conférence des recteurs des universités suisses, swissuniversities, a été chargée par la Confédération (Secrétariat d'Etat à la formation, la recherche et l'innovation SEFRI et l'OSAV), d'élaborer un concept de structure pour un nouveau centre national 3RCC. Le nouveau 3RCC a été fondé en mars 2018. Il est conçu sous forme de réseau avec 11 hautes écoles et il est placé sous la responsabilité des hautes écoles, de l'industrie (Interpharma), de la Confédération et de la Protection Suisse des Animaux PSA.

**Les attentes de l'OSAV vis-à-vis du nouveau 3RCC sont élevées, notamment pour les éléments-clés que sont la formation, la communication et la recherche 3R.**

Une **formation initiale, qualifiante et continue** solide des chercheurs est l'élément décisif pour améliorer de manière efficace et durable le sort des animaux d'expérience et pour diminuer le nombre d'animaux. Le lien direct avec les hautes écoles permet d'introduire désormais très tôt la thématique 3R dans le cursus des étudiants de toutes les branches scientifiques et médicales. L'objectif est d'instaurer une véritable culture 3R dans les détentions suisses d'animaux d'expérience, les instituts de recherche et les laboratoires.

Pour y arriver, le 3RCC doit élaborer et mettre en œuvre une stratégie de formation, qui tienne compte des divers types dans la formation initiale et qualifiante et qui assure la coordination entre les programmes existants des hautes écoles dans le domaine de l'enseignement 3R.

Ce point capital dans le domaine de la formation initiale, qualifiante et continue permet au 3RCC de se muer en un «Centre d'expertise pour le comportement conforme à la protection animale avec les animaux d'expérience» et, d'une manière générale, de se développer en une plate-forme pour l'échange de savoir et d'expériences au sein de la communauté de l'expérimentation animale. Le 3RCC est appelé à élaborer un concept de communication contenant la mise sur pied d'un point de contact professionnel pour les différents acteurs, qui permettra à l'avenir de mener une communication structurée avec les parties prenantes (étudiants, chercheurs, grand public, médias, autorités et politique).

---

<sup>1</sup> Principes 3R – Replace, Reduce, Refine (remplacer, réduire, améliorer)

<sup>2</sup> Avenir de la fondation 3R et méthodes de substitution à l'expérimentation animale, rapport du Conseil fédéral en réponse au postulat 12.3660 de la Commission de la science, de l'éducation et de la culture CN du 17.8.2012

Cette communication active vers l'intérieur et l'extérieur, doit assurer la plus grande transparence possible au sein de la communauté des chercheurs et de la population. Et finalement, on escompte une véritable mise en réseau internationale avec d'autres centres de compétences 3R en Europe et dans le monde, afin d'organiser au niveau mondial un échange de connaissances, d'expériences et de méthodes.

Il est impératif de développer une stratégie de recherche pour la **recherche 3R**, qui identifie et lance des projets de recherche compétitifs et d'un haut niveau qualitatif, qui prennent en compte tous les domaines 3R (replaces, reduce, refine). Les projets qui développent de nouvelles méthodes ou technologies jusqu'à leur implémentation et qui ne bénéficient pas d'autres instruments de soutien (comme le FNS) méritent une attention particulière. En l'occurrence, la recherche de méthodes alternatives est au cœur du débat. Dans le domaine réglementaire, le 3RCC doit jouer le rôle de catalyseur de la mise en œuvre/implémentation des méthodes sans expérimentation animale. Tant que cette dernière restera incontournable, il faudra également soutenir des études et projets qui développent des méthodes ménageant les animaux et qui visent une réduction effective et durable de la contrainte qui pèse sur les animaux. Par ailleurs, les méthodes visant des résultats de recherche pertinents et ne recourant qu'au nombre nécessaire optimal des animaux d'expérience, doivent elles aussi être soutenues.

Le développement d'instruments d'évaluation appropriés et «d'indicateurs-clés» pour le domaine 3R, doit mesurer les progrès réalisés dans l'enseignement et la recherche et les documenter dans des fiches techniques (monitorage). Il faudrait en outre créer des bases nécessaires à la gestion des résultats «non publiables» dans tous les domaines de recherche.

L'OSAV se réjouit d'une étroite collaboration avec le 3RCC. Il est tout disposé à reconnaître les progrès réalisés dans la mise en œuvre des principes 3R et à soutenir les prestations de tous les acteurs impliqués.

## **Le centre suisse de compétences sur les 3R: favoriser la recherche et la formation dans les 3R**

Dr Chantra Eskes, Directrice 3RCC, Berne, à l'occasion du 11<sup>e</sup> congrès de la PSA sur l'expérimentation animale «Le centre de compétences 3R (3RCC) – amélioration de la recherche et diminution du nombre d'expériences sur les animaux?», 18 mai 2018, Olten

Conformément à la législation suisse sur la protection des animaux, toute personne qui s'occupe d'animaux doit tenir compte au mieux de leurs besoins et veiller à leur bien-être dans la mesure où le but de leur utilisation le permet. Au cours de la dernière décennie, des progrès considérables ont été réalisés au niveau international en ce qui concerne les principes 3R, amélioration (refinement), réduction (reduction) et remplacement (replacement) dans l'expérimentation animale à des fins réglementaires. Le 27 mars 2018, le centre suisse de compétences sur les 3R (3RCC) a été porté sur les fonds baptismaux dans le but de soutenir les principes 3R dans la recherche et la formation.

Présidé par Dr Kathy Riklin, membre du Conseil national, le 3RCC représente une association d'académies, d'industries, d'autorités de réglementation, le gouvernement et la protection des animaux, y compris les onze plus importantes universités et institutions de formation supérieure de Suisse, l'Association des entreprises pharmaceutiques suisses (Interpharma), l'Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires (OSAV) et la Protection Suisse des Animaux PSA. Le 3RCC bénéficie également du soutien important du Secrétariat d'Etat à la formation, à la recherche et à l'innovation (SEFRI), en sa qualité de représentant d'un centre scientifique d'importance nationale fonctionnant sur une base non-commerciale conformément à l'art. 15 de la loi fédérale sur l'encouragement de la recherche et de l'innovation (LERI).

L'Université de Berne a aimablement hébergé les bureaux du centre suisse de compétences sur les 3R qui subventionnera des projets scientifiques de qualité et instaurera un programme de formation et une stratégie de communication pour promouvoir les principes 3R. Un premier appel à projets scientifiques est prévu pour la fin 2018. De surcroît, à travers le programme de formation et la stratégie de communication, le centre aspire à rendre accessible à tous les acteurs impliqués et/ou intéressés, des informations actualisées sur les méthodes de substitution à l'expérimentation animale. Enfin, le centre de compétences sur les 3R effectuera un monitoring des progrès réalisés en ce qui concerne la mise en œuvre de ses principes et proposera ses services aux autorités, institutions de formation et autres services intéressés souhaitant obtenir davantage d'informations sur les principes 3R et sur les méthodes de substitution à l'expérimentation animale.

## **La plate-forme de recherche Berlin-Brandebourg BB3R – recherche et formation graduée depuis 2014**

Prof. Dr Monika Schäfer-Korting, Institut de Pharmacie, Université libre de Berlin, à l'occasion du 11<sup>e</sup> congrès de la PSA sur l'expérimentation animale «Le centre de compétences 3R (3RCC) – amélioration de la recherche et diminution du nombre d'expériences sur les animaux?», 18 mai 2018, Olten

Fondée en 2014, la plate-forme de recherche Berlin-Brandebourg regroupe les trois compétences 3R dans la région et promeut la recherche systématique dans ce domaine. L'école doctorale intégrée est le premier institut au monde à offrir une qualification structurée dans les 3R à la relève scientifique, aux doctorants et aux professeurs assistants. Le Ministère allemand de l'éducation et de la recherche (Bundesministerium für Bildung und Forschung BMBF) soutient la plate-forme de recherche par un financement de démarrage.

11 membres de fondation effectuent des recherches dans les domaines suivants: modèles de maladie de la peau, immunologie, humain sur puce, nanotoxicologie, analyse de substances actives in-silico et conception de médicaments (réduction / remplacement). En ce qui concerne les expérimentations animales indispensables, on développe des mesures d'amélioration (refinement) et les contraintes dues aux pluriexpériences sont également étudiées dans le but de diminuer le nombre d'animaux utilisés. Dès le début, non seulement les doctorants, mais également trois professeurs assistants élargissent le cercle de scientifiques expérimentés. Neuf scientifiques chevronnés renforcent le consortium en qualité de membres associés. Les premiers diplômés occupent déjà des postes de direction ou ont été appelés à occuper des postes universitaires, ce qui leur permet de poursuivre leur recherche axée sur les 3R dans le cadre national et international.

Outre le projet de recherche, des symposiums pour doctorants, une série de séminaires 3R et des spring schools annuelles sont organisés régulièrement. En l'occurrence, on attache une attention particulière à dispenser des connaissances sur tous les 3R. Des cours de la Dahlem Research School (DRS) de l'Université libre de Berlin, dont nous dépendons, dispensent des compétences générales (par exemple, la présentation, les évaluations statistiques, la bonne pratique scientifique). Des doctorants externes peuvent être admis dans l'école doctorale dans la mesure où ils travaillent dans un des domaines 3R et remplissent les exigences qualitatives de la DRS.

La recherche du consortium est présentée en étant illustrée par des exemples choisis. Le groupe de travail Schönfelder se penche sur le développement d'une thérapie individualisée de la douleur dans les souches de souris, car la souris reste l'animal le plus utilisé en recherche. Les nouvelles connaissances devraient permettre d'améliorer les recommandations en matière de dosage de la buprénorphine pour différentes souches de souris afin de réduire les douleurs au minimum indispensable pendant la recherche (refinement, c'est-à-dire amélioration).

Quant au groupe de travail Schäfer-Korting, il établit des modèles tumoraux du cancer clair de la peau et des tumeurs de la tête et du cou pour examiner la prise et les effets des cytostatiques. Dans ce dernier cas, la transférabilité des résultats est de loin la plus faible. On devrait contrer cela au moyen d'une stratégie de test intégrée, en testant avec un médicament candidat dans la phase préclinique le caractère approprié et la tolérance tout d'abord sur un modèle 3D. Seules les substances qui réussissent doivent être testées sur les animaux pour la tolérance afin d'exclure autant que possible les effets indésirables lors de la première utilisation chez l'être humain.



# Cultures cellulaires de poumons humains: un exemple de la recherche au nouveau centre de compétences 3R de la Charité

Prof. Dr méd. Stefan Hippenstiel, Clinique médicale, Charité – Université de médecine, Berlin, à l'occasion du 11<sup>e</sup> congrès de la PSA sur l'expérimentation animale «Le centre de compétences 3R (3RCC) – amélioration de la recherche et diminution du nombre d'expériences sur les animaux?», 18 mai 2018, Olten

La pneumonie (infection pulmonaire) fait partie des cinq causes de décès humains les plus fréquentes dans le monde; en Europe, elle a même un caractère épidémique. Les études menées sur de grands collectifs de patients montrent que le taux de mortalité de 13% environ n'a pas changé en soixante ans. C'est d'autant plus étonnant quand on pense aux efforts considérables déployés par la recherche fondamentale, aux progrès de la médecine intensive et aux vaccins disponibles contre l'agent pathogène de la pneumonie.

L'agent pathogène isolé le plus souvent est de loin la bactérie *Streptococcus pneumoniae*. Ce sont tout particulièrement les agents pathogènes viraux des zoonoses, comme les virus de l'influenza ou les coronavirus SARS et MERS qui, de surcroît, ont un gros potentiel épidémique et pandémique.

Au moment de faire des recherches sur cet agent pathogène, il faut savoir que le *Streptococcus pneumoniae* est un agent pathogène strictement humain tandis que les virus précités ont une forte spécificité d'espèce. Dès lors, ils n'ont qu'une pertinence très limitée pour l'être humain lorsqu'ils sont étudiés dans des modèles animaux; pour certains, il n'y a du reste que des modèles très insuffisants (1, 2). Ces exemples montrent déjà clairement que les modèles animaux, du moins en relation avec de nombreuses maladies, ne sont transférables à l'homme que de manière très limitée. En outre, il y a des différences notables dépendant de l'espèce, tout particulièrement dans les caractéristiques physiologiques et pathophysiologiques. Le recours à des populations d'animaux d'expérience les plus homogènes possible et d'autres aspects contribuent à ce que de nombreuses approches réussies en recherche fondamentale et préclinique échouent lors de leur transfert clinique. Il y a donc non seulement des raisons éthiques, mais aussi de nombreuses raisons scientifiques pour développer avec énergie de solides méthodes de substitution à l'expérimentation animale. Par conséquent, le nouveau Centre Charité 3R poursuit l'objectif de regrouper toutes les activités 3R de la faculté, en mettant l'accent sur le développement systématique de méthodes de substitution. D'entrée de jeu, on vise une collaboration interdisciplinaire avec des partenaires locaux et externes. Les acteurs impliqués sont convaincus que le développement des modèles représente déjà à lui seul un grand défi scientifique et qu'il faudrait déployer des efforts notables en matière de standardisation et de distributivité (par exemple, cryoconservation).

A titre d'exemple, nous présentons ici un modèle d'une culture ex vivo et d'infection d'un tissu pulmonaire humain, qui permet d'étudier les processus pertinents d'infection par des bactéries (3-6) et des virus (7-11) dans la pneumonie. En l'occurrence, il ne faut pas oublier que bien entendu ce modèle dans sa forme actuelle a lui aussi ses limitations inhérentes, c'est-à-dire que ni la respiration ni la circulation sanguine ne sont prises en compte. Ce tissu permet de faire des études comparatives des répliquations d'agents pathogènes viraux et bactériens sur la base d'isolats cliniques sans qu'il soit nécessaire de procéder à des adaptations, ce qui à son tour permet de déterminer la véritable virulence de l'agent pathogène. En recourant à la microscopie spectrale et confocale, le tropisme de l'agent pathogène et le modèle destructeur alvéolaire local peuvent être identifiés. Cette microscopie à résolution spatio-temporelle élevée permet par exemple de suivre en temps réel le mouvement et la localisation des mitochondries et l'émergence de l'apoptose dans un tissu tridimensionnel à l'aide

d'un agent pathogène fluorescent. On utilise également des méthodes traditionnelles par exemple pour mesurer l'activation inflammatoire (comme l'interféron). Sur la base de protéines marquées, par exemple GFP-transmis au moyen de la transduction virale, des mécanismes moléculaires peuvent être analysés dans un tissu différencié.

Dans l'ensemble, cette méthode n'est pas seulement une alternative à l'expérimentation animale classique, mais elle permet aussi (avec ses propres limitations) d'obtenir des énoncés d'une pertinence bio-médicale, que l'on n'obtient pas avec les modèles animaux.

#### Références bibliographiques

1. K. Zscheppang *et al.*, Human Pulmonary 3D Models For Translational Research. *Biotechnol J* **13**, (2018).
2. A. C. Hocke, N. Suttorp, S. Hippenstiel, Human lung ex vivo infection models. *Cell Tissue Res* **367**, 511-524 (2017).
3. A. Nerlich *et al.*, Pneumolysin induced mitochondrial dysfunction leads to release of mitochondrial DNA. *Sci Rep* **8**, 182 (2018).
4. A. Peter *et al.*, Localization and pneumococcal alteration of junction proteins in the human alveolar-capillary compartment. *Histochem Cell Biol* **147**, 707-719 (2017).
5. D. Fatykhova *et al.*, Serotype 1 and 8 Pneumococci Evade Sensing by Inflammasomes in Human Lung Tissue. *PLoS One* **10**, e0137108 (2015).
6. K. V. Szymanski *et al.*, Streptococcus pneumoniae-induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue. *Eur Respir J* **40**, 1458-1467 (2012).
7. J. Berg *et al.*, Tyk2 as a target for immune regulation in human viral/bacterial pneumonia. *Eur Respir J* **50**, (2017).
8. J. Knepper *et al.*, The novel human influenza A(H7N9) virus is naturally adapted to efficient growth in human lung tissue. *MBio* **4**, e00601-00613 (2013).
9. A. C. Hocke *et al.*, Reply to Fujino *et al.* *J Infect Dis* **207**, 693-695 (2013).
10. A. C. Hocke *et al.*, Emerging human middle East respiratory syndrome coronavirus causes widespread infection and alveolar damage in human lungs. *Am J Respir Crit Care Med* **188**, 882-886 (2013).
11. V. K. Weinheimer *et al.*, Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung. *J Infect Dis* **206**, 1685-1694 (2012).

## Concept Tox21: toxicologie sans expérimentation animale

Prof. Dr méd. Horst Spielmann, Institut de Pharmacie, Université libre de Berlin, à l'occasion du 11<sup>e</sup> congrès de la PSA sur l'expérimentation animale «Le centre de compétences 3R (3RCC) – amélioration de la recherche et diminution du nombre d'expériences sur les animaux?», 18 mai 2018, Olten

Etant donné que le développement de nouveaux médicaments au moyen d'expériences sur les animaux devient de plus en plus onéreux et que de nombreux médicaments ont eu un effet toxique ou se sont révélés inefficaces sur l'homme, des experts de l'Académie américaine des sciences (US Academy of Science) ont essayé d'élaborer un nouveau concept scientifique pour développer des médicaments, et ce indépendamment des problèmes éthiques et des expérimentations animales. Les résultats ont été publiés en 2007 dans l'ouvrage «Tests de toxicité au 21<sup>e</sup> siècle: une vision et une stratégie». Ils sont arrivés à la conclusion que dans un avenir qui n'est pas si lointain, tous les tests de toxicité de routine seront effectués sur des cellules humaines ou des lignes cellulaires in vitro en évaluant les perturbations des réactions cellulaires dans une série de tests sur les voies toxiques («in a not-so-distant future all routine toxicity testing will be conducted in human cells or cell lines in vitro by evaluating perturbations of cellular responses in a suite of toxicity pathway assays...»)

Un élément essentiel de ce «concept Tox21» était l'idée que les effets toxiques de corps étrangers, de médicaments et même de substances actives appartenant au corps, comme les hormones, se fondent sur une perturbation des voies métaboliques habituelles, ce que l'on appelle en anglais *Adverse Outcome Pathways* (AOPs).

Dès lors qu'il est possible depuis 20 ans de cultiver des cellules et tissus humains dans des conditions physiologiques, le concept d'AOP a été confirmé par les scientifiques dans les universités, l'industrie et les autorités, après avoir été contrôlé à fond. En Europe, le projet de l'UE AXLR8 (= accelerate, accélérer) y a contribué et j'ai eu l'occasion d'en assurer la coordination de 2009 à 2012 à l'Université libre de Berlin. Un premier succès, fondé sur le concept d'AOP a été le développement de nouvelles méthodes d'examen de l'OCDE pour la sensibilisation de la peau en utilisant des cellules et tissus humains, rendant les expérimentations animales superflues. Le concept Tox21 a donc causé un changement paradigmatique sur le plan international de telle manière que désormais dans tous les domaines de la pharmacologie et de la toxicologie, il doit être pris en compte lors de nouvelles méthodes d'examen, et ce avec des cellules et tissus humains. Cela aboutit naturellement à remplacer les expérimentations animales qui étaient prescrites auparavant.

La technique «organes multiples sur puce» (multi-organ-chips) a apporté une contribution décisive; on peut y cultiver plusieurs organes humains en miniature. Dans l'intervalle, on les utilise pour développer de nouveaux médicaments et pour évaluer le risque de composants des produits cosmétiques qui ne peuvent plus être testés sur des animaux en Europe.

Après avoir contrôlé le concept Tox21, l'Académie américaine des sciences a publié l'étude «Using 21st Century Science To Improve Risk Related Science» dans laquelle les experts arrivent à la conclusion que ce concept améliore de façon décisive la qualité de l'évaluation du risque pour la protection de la santé et de l'environnement. Afin de mettre en pratique cette découverte, les principales autorités fédérales des Etats-Unis – FDA, EPA et NIH – ont lancé et soutenu fin 2017 de vastes programmes pour développer de nouveaux médicaments et substances chimiques plus sûrs dans des produits au contact des consommateurs. Il ne reste plus qu'à espérer que l'Europe et les autres nations industrielles vont leur emboîter le pas, car le concept Tox21 confirme la supériorité scientifique des méthodes de recherche sans expérimentation animale.

# A la recherche d'alternatives au sérum de veau fœtal – la lumière au bout du tunnel

Prof. Dr Gerhard Gstraunthaler, Département de Physiologie, Université de Médecine, Innsbruck, à l'occasion du 11<sup>e</sup> congrès de la PSA sur l'expérimentation animale «Le centre de compétences 3R (3RCC) – amélioration de la recherche et diminution du nombre d'expériences sur les animaux?», 18 mai 2018, Olten

L'utilisation de sérums comme supplément aux milieux de culture fait désormais partie depuis des années de la routine des cultures cellulaires et tissulaires. Les sérums, et tout particulièrement le sérum de veau fœtal (SVF), approvisionnent les cultures avec des hormones, des facteurs de croissance et d'agrégation, des protéines de liaison et de transport, des acides aminés complémentaires, des vitamines et des oligo-éléments.

L'utilisation du sérum de veau fœtal recèle toutefois toute une série d'inconvénients. Les sérums peuvent contenir des toxines bactériennes (endotoxines) et des micro-organismes indésirables comme des bactéries (mycoplasmes compris), des virus ou encore des prions. En outre, de très fortes oscillations saisonnières et géographiques interviennent dans la composition qualitative et quantitative de chaque charge de sérum, raison pour laquelle il faut souvent procéder à leur contrôle qui est coûteux. L'utilisation du sérum va donc de pair avec l'introduction d'un mélange indéfini de substances actives sur le plan biologique dans un milieu de culture défini.

Le sérum de veau fœtal étant un sous-produit de l'industrie de la viande bovine, le marché du sérum dépend de nombreux facteurs externes. Cela suscite régulièrement la question de savoir s'il est vraiment possible de couvrir le besoin mondial en sérum de veau fœtal dans la recherche et l'industrie des biotechnologies. Des scandales publiés récemment sur le sérum de veau mélangé à d'autres substances n'ont fait que renforcer encore davantage les préoccupations concernant la pureté et la qualité des sérums.

La méthode d'obtention du sérum est toutefois le plus gros inconvénient. En effet, le sérum de veau fœtal est prélevé sur des fœtus de vaches gravides. On suppose qu'environ 800 000 litres par an de sérum de veau fœtal sont nécessaires globalement, ce qui correspond à tout juste 2 millions de fœtus de veau. Pendant ces dernières années, les préoccupations éthiques concernant le mode d'obtention du sérum se sont exprimées de plus en plus fort; une série de possibilités de substitution ont été présentées afin d'en diminuer l'utilisation (*reduction*) voire de les remplacer complètement (*replacement*) dans le sens des **3R** pour faire baisser les chiffres annuels de fœtus de veaux.

En dépit de nombreuses approches innovantes et du développement de milieux sans sérums pour de nombreuses cellules, l'ajout de sérum de veau fœtal est et reste le moyen privilégié dans la culture cellulaire.

Afin de pallier ces inconvénients du recours au sérum, afin de créer des conditions de cultures définies et contrôlées et pour des raisons de protection animale, on a recherché activement des méthodes de substitution au sérum dans les cultures cellulaires. Désormais une solution prometteuse se dessine à l'horizon.

## **Lysats de thrombocytes, une alternative au sérum de veau fœtal (SVF)**

Les tout derniers développements sont des lysats de concentrés de thrombocytes humains (human platelet lysates, hPL), enrichis de facteurs de croissance thrombocytaires. Le sérum contient des facteurs de croissance mitogéniques en grand nombre, qui sont libérés des thrombocytes activés lors de la coagulation. De nombreux facteurs ont déjà été identifiés comme mitogènes essentiels dans un milieu de culture sans sérum. Par ces réflexions, il est établi depuis quelques années que les lysats provenant de thrombocytes humains servent

de substituts complets au sérum de veau foetal dans de nombreux systèmes de culture différents. Le produit de base est constitué par des dons de thrombocytes périmés provenant de banques du sang. Les thrombocytes des donneurs ont une durée de vie de 5 jours seulement, pendant lesquels leur utilisation clinique est autorisée. Dès lors, des concentrés de thrombocytes provenant de donneurs sont régulièrement disponibles.

Il faut examiner l'utilisation de lysats de thrombocytes (hPL) dans la culture cellulaire à la lumière de la physiologie des thrombocytes. Ces derniers (plaquettes du sang) produisent une série de facteurs de croissance qu'ils stockent dans leur  $\alpha$ -granules pour le libérer après activation. Ces facteurs jouent un rôle décisif dans la coagulation du sang et la guérison des plaies qui suit.

Dans l'obtention du sérum, le processus de coagulation en cours est d'une importance décisive pour la qualité du sérum. Dès lors, on peut partir de l'hypothèse que les facteurs essentiels pour la prolifération des cellules cultivées qui sont attestés dans le sérum, tels que notamment EGF, PDGF, FGF, TGF- $\beta$ , VEGF, proviennent de thrombocytes. La teneur élevée en facteurs de croissance spécifiques fait ainsi des lysats de thrombocytes humains un produit de substitution remarquable pour la culture cellulaire et tissulaire, et ce même si sa définition n'est pas parachevée.

Comme nous l'avons précisé ci-dessus, le matériel de base est constitué de concentrés de thrombocytes périmés qui ont été obtenus au moyen de l'aphérèse, procédé réalisé dans des banques de sang certifiées. En l'occurrence, on dispose après la date de péremption d'un produit de base, certifié, dont la qualité a été testée pour l'utilisation thérapeutique (don de thrombocytes), fabriqué conformément aux directives européennes. Les thrombocytes des donneurs sont lavés, remis en suspension dans une solution saline puis lysés dans un processus simple de congélation et dégel. Les lysats peuvent être ajoutés aux cultures de base comme substituts de sérum, comme MEM, DMEM, DMEM/Ham F-12 ou RPMI-1640 dans une concentration de 5 % (v/v).

En outre, les lysats de thrombocytes humains (hPL) représentent un système de culture provenant exclusivement de facteurs humains. Ce type de systèmes exempts de tous composants d'origine animale (animal-derived component-free) se prête particulièrement à la culture de cellules-souches et à l'ingénierie tissulaire.

Le sérum de veau foetal ne peut pas être obtenu ni fabriqué par soi-même. La disponibilité de concentrés de thrombocytes de donneurs après leur date de péremption dans les banques de sang et la simplicité de la production de lysats laissent toutefois espérer que cette approche à la fois innovante et couronnée de succès d'un substitut au sérum, sera de plus en plus utilisée dans les laboratoires de culture cellulaire.

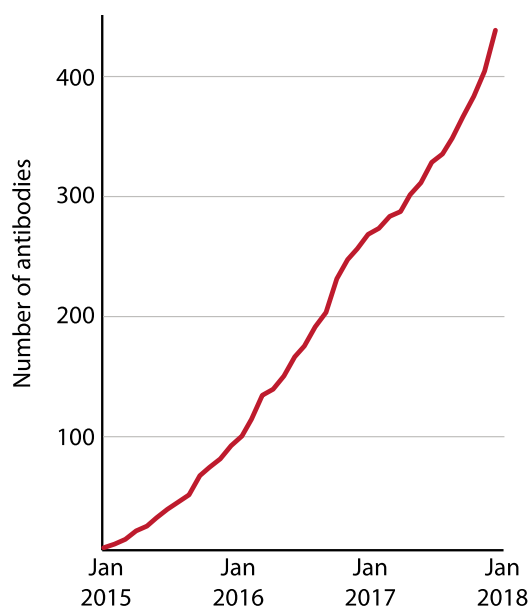
# Anticorps recombinants (recherche, production et implémentation)

Prof. Dr Pierre Cosson, Département de Physiologie Cellulaire et Métabolisme, Université de Genève, à l'occasion du 11<sup>e</sup> congrès de la PSA sur l'expérimentation animale «Le centre de compétences 3R (3RCC) – amélioration de la recherche et diminution du nombre d'expériences sur les animaux?», 18 mai 2018, Olten

Le processus qui permet le remplacement de l'expérimentation animale dans la recherche biomédicale est long et complexe. Ainsi, la technologie des anticorps recombinants permet en principe depuis plus de 20 ans de produire des anticorps sans utiliser d'animaux. Le recours à cette technologie pourrait permettre de réduire de façon importante le nombre d'animaux utilisés dans les laboratoires, tout en facilitant le travail de recherche. Pourtant cette technologie ne s'est pas encore étendue aux laboratoires de recherche fondamentale dans le domaine biomédical, principalement à cause de sa relative sophistication et de son coût. Notre objectif général est de promouvoir le remplacement des anticorps d'origine animale par des anticorps recombinants entièrement produits in vitro.

En 2014, nous avons ouvert à Genève un centre universitaire afin de proposer l'accès à la technologie des anticorps recombinants aux laboratoires de recherche fondamentale et de réduire l'utilisation d'animaux dans la recherche. Ce centre s'est concentré sur la découverte de nouveaux anticorps recombinants, et en a produit des centaines (graphique 1).

Un nouveau projet actuellement en cours est de créer une base de données complète de tous les anticorps recombinants découverts à ce jour. Cette base de données sera associée à un centre de production qui donnera l'accès à tous ces anticorps. Notre vision à long terme est de créer un centre complètement ouvert qui produira des anticorps in vitro pour la communauté scientifique mondiale. Cet exemple illustre le potentiel et la difficulté à mettre en application une nouvelle technologie alternative à l'expérimentation animale.



Graphique 1 : nombre d'anticorps recombinants disponibles au Geneva Antibody Facility. <https://www.unige.ch/antibodies>

# The Scar in the Jar – un système in vitro pour tester les substances antifibrotiques

Prof. Dr Michael Raghunath, Direction du Département spécialisé de biologie cellulaire et de génie tissulaire, Haute Ecole des Sciences appliquées ZHAW, Zurich, à l'occasion du 11<sup>e</sup> congrès de la PSA sur l'expérimentation animale «Le centre de compétences 3R (3RCC) – amélioration de la recherche et diminution du nombre d'expériences sur les animaux?», 18 mai 2018, Olten

On peut reconnaître les cicatrices parce que leur apparence diffère de celle du tissu normal. Le tissu des cicatrices est le résultat d'une réparation rapide et représente une accumulation de fibres de collagène aux endroits d'une réaction de guérison à des blessures. Au cours de l'évolution, cette réaction n'a pas été sélectionnée pour sa belle apparence ni même pour la reconstitution de la fonction pleine et entière, mais pour une reformation rapide de la cohésion tissulaire (les remèdes miracles de mère Nature). La formation des cicatrices s'effectue selon un protocole assez stéréotypé: après la blessure, c'est-à-dire après interruption de l'architecture tissulaire locale (déchirure, coupure, cratère), la plaie saigne puis le sang s'arrête de couler. Ensuite vient la phase d'infection, dans laquelle les macrophages recherchent la lésion, sortent des bactéries de la circulation, digèrent les tissus endommagés et favorisent l'apparition des cellules réparatrices, des fibroblastes et des cellules des vaisseaux sanguins (phase de prolifération). A ce moment-là, la plaie est un véritable chantier où règnent démontage et reconstruction et où à la fin, c'est la construction qui l'emporte. Le matériel de construction est une matrice extracellulaire, formée avant tout de collagène. Ce dernier crée des systèmes de fibres qui comblent et couvrent les manques de la blessure pour que des cellules puissent passer par-dessus et former une couverture fermée. Les fibres de collagène sont plus denses que le tissu normal, ce qui permet de reconnaître une cicatrice à l'œil nu et au microscope. Pendant les diverses phases de la guérison de la plaie, la phase de régénération aboutit à la fermeture de la plaie. La cicatrice de collagène continue de mûrir; elle se consolide, mais son volume diminue. Il faut au moins un an pour que les cicatrices d'une opération puissent passer de la couleur rouge à la couleur blanche. Toute intervention chirurgicale entraîne la formation d'une cicatrice dans toutes les couches tissulaires.

Les cicatrices de la peau peuvent considérablement limiter l'apparence et la fonction de la peau - mobilité et élasticité. Mais quand la cicatrisation touche l'ensemble d'un organe, la vie est en danger. En effet, une infection déclenche la formation d'une cicatrice. Cela signifie que sans véritable blessure, des processus d'infection chronique (substances toxiques, infections virales) peuvent déclencher des processus de cicatrisation qui concernent des organes comme le foie et le poumon. Le nombre de nouveaux cas (incidence) de cirrhose du foie (une dénomination particulière pour la fibrose hépatique) s'élève dans les pays industrialisés à 250 pour 100 000 habitants par an. Outre les cirrhoses hépatiques dues à l'alcool, l'hépatite virale chronique est la deuxième cause de mortalité (20–25 %) dans les pays industrialisés, en Afrique, elle est même la plus fréquente 90% – dans la plupart des cas, il s'agit de l'hépatite C.

Afin de bloquer une fibrose et la formation locale d'une cicatrice, il faut calmer l'infection et pouvoir intervenir dans le métabolisme du collagène. Si c'était possible, le mieux serait soit d'arrêter la sécrétion de collagène soit son dépôt autour des cellules productrices. Les études de guérison des plaies chez les petits animaux d'expériences utilisés habituellement, comme les rats et les souris, doivent tenir compte du fait que les plaies cutanées de ces animaux tendent à guérir plutôt par contraction que par cicatrisation. Des formes particulières de la cicatrisation comme la chéloïde semblent propres à l'homme et ne peuvent être reproduites que de manière incomplète dans l'expérimentation animale. Les modèles de fibrose hépatique sont créés chez les rats en général en leur donnant des substances toxiques pour le foie comme le tétrachlorure de carbone. Les expériences animales sont coûteuses et complexes.

Il existe des systèmes de culture cellulaire pour prétester in vitro des antifibrotiques; malheureusement, le dépôt de collagène, c'est-à-dire la formation d'une structure de fibres autour des cellules est très inefficace dans le milieu de culture standard. Cela tient au fait que l'enzyme BMP-1, qui transforme le procollagène en collagène dans le milieu de culture, ne travaille que très lentement en milieu aqueux. Or seul le collagène peut s'amasser en fibres non solubles, et non le procollagène. Par conséquent, BMP-1 est un facteur limitant de la formation de matrice de collagène in vitro. La majorité des groupes de travail académiques et pharmaceutiques n'en ont pas encore conscience. Le milieu de culture standard est un milieu artificiel et très aqueux, dans lequel il n'y a habituellement pas de cellules. Dans la réalité, l'intérieur des cellules est rempli d'un grand nombre de macromolécules et le microenvironnement des cellules est dominé par les macromolécules; il y a peu d'eau libre que ce soit à l'intérieur ou dans l'environnement des cellules. Cet état est appelé encombrement moléculaire (macromolecular crowding). Depuis 15 ans, nous avons développé de l'encombrement moléculaire artificiel pour la culture cellulaire (Chen et al 2011). Introduire des macromolécules (le plus souvent des polymères de sucre) accélère considérablement l'activité de trimming du procollagène effectuée par l'enzyme BMP-1, entraînant ainsi la conversion rapide du procollagène en collagène et donc, pour la première fois, aboutit à un dépôt de collagène efficace in vitro. D'autres enzymes qui connectent chimiquement la structure du collagène en le stabilisant sont également accélérés de même que la polymérisation de molécules de collagène, la formation de fibrilles. En nous appuyant sur l'encombrement moléculaire, nous avons créé un système de culture intelligent, dans lequel toute la cascade de cicatrices peut être reproduite dans une boîte de culture et dans lequel les processus biochimiques et enzymatiques pertinents se déroulent de manière efficace.

Nous avons testé avec succès ce système (scar in a jar) et nous pouvons avec des substances antifibrotiques de deux sociétés pharmaceutiques différentes prouver avec certitude quelle substance a de l'effet et laquelle n'en a pas (Chen et al. 2009). Si une des entreprises avait utilisé l'encombrement moléculaire in vitro, la non-efficacité de la substance serait apparue plus clairement et aurait rendu superflues les expérimentations animales qui ont suivi. Après coup, on a compris pourquoi les résultats des expériences sur les animaux n'avaient que des résultats flous, et ce avec des coûts élevés. La scar-in-a-jar comble une lacune dans les tests dans le développement d'antifibrotiques et elle a été acceptée par l'industrie. Depuis 2011 elle est utilisée avec succès chez GlaxoSmithKline pour tester in vitro les substances pour soigner la fibrose pulmonaire.

### Références

Chen CZC, Loe F, Blocki A, Peng Y, Raghunath M. Applying macromolecular crowding to enhance extracellular matrix deposition and its remodeling in vitro for tissue engineering and cell-based therapies. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011 Apr 30;63(4-5):277-290.

Chen C, Peng Y, Wang Z, Fish, P, Kaar J, Koepsel R, Russell A, Lareu R., Raghunath, M. 2009. The Scar-in-a-Jar: Studying antifibrotic lead compounds from the epigenetic to extracellular level in a single well. *Br J Pharmacol* 158(5):1196-209



# Systèmes microphysiologiques dans la recherche translationnelle – applications et perspectives

PD Dr rer. nat. Alexander S. Mosig, Institut de biochimie, Clinique universitaire, Jena, à l'occasion du 11<sup>e</sup> congrès de la PSA sur l'expérimentation animale «Le centre de compétences 3R (3RCC) – amélioration de la recherche et diminution du nombre d'expériences sur les animaux?», 18 mai 2018, Oltten

Au cours de ces dernières années, l'attention du monde scientifique s'est de plus en plus portée sur le rôle du microbiote dans le fonctionnement de l'intestin humain. Pour le maintien d'une bonne santé, le caractère essentiel d'une interaction physiologique intestin-microbiote apparaît de plus en plus clairement. Un déplacement dans la composition du microbiote (défini comme l'ensemble des microorganismes vivant dans l'homme) qui le transforme en un microbiote défavorable sur le plan physiologique, voire un microbiote dominé par des agents pathogènes (dysbiose) a par conséquent un impact décisif sur l'émergence et l'évolution de maladies comme les maladies infectieuses de l'intestin, la défaillance de certains organes chez les malades critiques et l'apparition de la sepsis.

Lors d'une sepsis aiguë, la perte de la fonction de barrière épithéliale et endothéliale de l'intestin est une modification pathologique typique, dont la recherche des causes occupe la discussion actuelle sur divers mécanismes. On admet que les signaux d'une réaction immunitaire exagérée autant qu'une interaction directe des pathogènes microbiens avec les cellules épithéliales et endothéliales entraînent la perte de fonction de barrière. Conséquence des réactions infectieuses systémiques qui s'en suivent, il y a des troubles multiples des fonctions organiques, en l'occurrence, le foie étant le premier organe touché du fait de son lien direct avec l'intestin. Or le foie abrite environ 80% de tous les macrophages présents dans le corps. Des monocytes en circulation ne cessent de patrouiller dans le système des vaisseaux hépatiques à la recherche de substances moléculaires associées à des pathogènes; une fois qu'ils les ont détectées, ils peuvent pénétrer dans le tissu hépatique. Dans les conditions physiologiques, afin d'éviter des réactions immunitaires indésirables, des endotoxines du microbiote sont tolérées par le foie dans des limites clairement définies. Une régulation stricte de la réaction inflammatoire d'une part, et de l'immunotolérance d'autre part, est nécessaire pour garantir une défense efficace contre l'infection. Dans ce contexte, l'activation des macrophages joue un rôle crucial étant donné que ces cellules sont en mesure de déclencher à la fois des réactions infectieuses pour lutter contre des infections bactériennes et la tolérance de volumes d'endotoxines physiologiques.

En raison des limitations des méthodes *in vitro* actuellement disponibles, on recourt fréquemment à des modèles animaux pour étudier les bases physiologiques d'une interaction physiologique entre l'intestin et le foie ou leur dérégulation lors de l'émergence d'infections et de sepsis. Les importantes similitudes anatomiques et génétiques entre la souris et l'homme ainsi que les faibles coûts de détention, le taux élevé de reproduction et la brièveté du cycle de vie par rapport à d'autres mammifères, ont fait de la souris un modèle animal très utilisé au cours des années écoulées dans la recherche sur les infections. Il y a toutefois des différences essentielles entre ces deux espèces dues à des différences évidentes de l'alimentation, de l'habitat et de la taille entre la souris et l'homme. Citons ici les besoins spécifiques d'une espèce vis-à-vis du métabolisme qui ont, du fait de l'évolution, entraîné des différences significatives non seulement dans la construction et la microanatomie de l'intestin mais aussi dans la fonction et la composition du système immunitaire.

En raison de ces importantes limitations, nous avons développé des modèles microphysiologiques de l'intestin et du foie humains qui nous permettent de représenter *in vitro* dans les conditions physiologiques pertinentes l'interaction complexe entre les deux organes. Les modèles d'organes sont déjà utilisés de manière routinière pour les patients comme outils centraux dans l'étude des bases pathophysiologiques de la défaillance de l'organe lors d'une

sepsis et lors du développement de nouvelles approches thérapeutiques. En même temps, les modèles constituent la base d'un remplacement durable des expérimentations animales dans la recherche du Centre intégré de recherche et de traitement de la sepsis et séquelles de la sepsis de la Clinique universitaire de Jena et même au-delà dans des projets de recherche interrégionaux avec des partenaires de la recherche académique et industrielle. Je souhaiterais dans mon exposé vous présenter de plus près ces modèles d'organes et la technologie organe sur puce (organ-on-a-chip) qui va de pair.