



## Dans ce numéro

### page 1

Editorial

### page 2 & 3

Une priorité  
de la BPAM :  
le remplacement

### page 4

Opinion :  
A propos des 3 "R"

## BPAM

Plate-forme belge  
des méthodes alternatives à  
l'expérimentation animale

La BPAM est un  
département scientifique de  
la Fondation Prince Laurent

## Pour contacter la BPAM :

### BPAM

Av. P. Deschanel, 36-38  
B-1030 Bruxelles - Belgique

Tel.: +32 (0)2 244 97 05

+32 (0)2 243 08 97

Fax : +32 (0)2 243 09 47

[www.fondation-prince-laurent.be](http://www.fondation-prince-laurent.be)

[bpam@fondation-prince-laurent.be](mailto:bpam@fondation-prince-laurent.be)

Compte bancaire BPAM  
603-1050018-37

# Editorial

*Le remplacement de l'animal d'expérience est, sans aucun doute, le plus important des 3 "R" de Russell et Burch. La réduction du nombre d'animaux et le raffinement des méthodes gardent cependant tout leur intérêt du point de vue du bien-être des animaux utilisés à des fins expérimentales.*

*En effet, au niveau de l'Union européenne, on entend par méthode alternative : "une méthode qui n'implique pas l'utilisation d'animaux ou, à défaut, une méthode qui réduit sensiblement le nombre d'animaux utilisés ou une méthode qui diminue sensiblement la souffrance des animaux"<sup>1</sup>. La BPAM souscrit entièrement à cette interprétation. Dans le contexte législatif européen, une autre définition utile est celle de l'animal (d'expérience) : "tout vertébré vivant non humain, y compris les formes larvaires autonomes et/ou capables de reproduction, mais à l'exclusion des formes fœtales ou embryonnaires"<sup>2</sup>.*

*Revenons au remplacement. Selon les auteurs, il sera direct ou indirect, total ou partiel. D'après Russell et Burch, le remplacement sera absolu ou relatif.*

*Dans le remplacement absolu, on n'utilisera plus aucun animal. A la place de celui-ci seront utilisées par exemple, des cultures cellulaires ou tissulaires d'origine humaine ou provenant d'invertébrés. Un exemple : le remplacement du test de pyrogénicité (détection de substances qui provoquent de la fièvre) effectué sur lapins, par un test enzymatique utilisant le "sang" du "crabe en fer à cheval", ou limule polyphème, le "horseshoe crab" des anglo-saxons. La Pharmacopée européenne utilise d'ailleurs cette substitution dans ses monographies. Récemment, deux chercheurs singapouriens sont parvenus à cloner l'enzyme en question, ce qui permettra de protéger la limule, espèce menacée. Un double remplacement, en quelque sorte.*

*Le remplacement relatif peut prendre plusieurs formes. Dans le cas du prélèvement d'organes, de tissus ou de cellules de mammifères qui serviront de substrat aux essais, l'expérimentation ne se fera plus sur l'animal entier, bien que celui-ci ait servi de "donneur" pour l'obtention du matériel nécessaire.*

*La substitution d'une espèce animale considérée comme plus évoluée, telle le singe, par une autre espèce dite moins évoluée, telle la souris, constitue une autre forme de remplacement relatif. C'est le cas du test de neurovirulence pour le vaccin polio, pratiqué sur souris transgéniques, dont la validation au niveau international est en cours, sous l'égide de l'OMS (Organisation mondiale de la Santé).*

<sup>1</sup> Journal Officiel des Communautés européennes, C113E du 14 mai 2002, page 111

<sup>2</sup> Ibidem

# Une priorité de la BPAM : le remplacement

*De l'in vivo vers l'in vitro  
Bioproduction d'anticorps monoclonaux par des technologies alternatives à la méthode de l'ascite chez les rongeurs.*

## Anticorps monoclonaux

Les anticorps sont des glycoprotéines synthétisées par des cellules du système immunitaire appelées lymphocytes B. A l'état naturel, ces glycoprotéines présentent une structure moléculaire et des

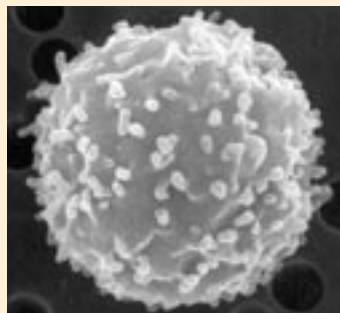
propriétés hétérogènes. Cependant, pour les besoins de la médecine diagnostique, la thérapeutique et la recherche fondamentale, il est nécessaire de produire des anticorps de structure et de propriétés homogènes. Issues d'un même clone cellulaire, ces molécules sont alors appelées : anticorps monoclonaux.

## Production des anticorps : *in vivo* ou *in vitro* ?

La biosynthèse des anticorps monoclonaux se déroule en deux étapes. La première, pour laquelle il n'existe aucune alternative à l'utilisation d'animaux, mais qui se révèle peu traumatisante pour ces derniers, consiste à obtenir des cellules productrices d'anticorps qui se multiplient indéfiniment. Pour ce faire, on immunise quelques souris dont on isole, après euthanasie, les cellules productrices d'anticorps. Celles-ci proviennent de la rate ou des ganglions lymphatiques. Elles sont ensuite fusionnées avec des cellules cancéreuses pour obtenir des hybrides cellulaires appelés "hybridomes". Les clones cellulaires sélectionnés sont ensuite mis en culture pour assurer la production d'anticorps. Pour cette deuxième étape, on a recours à des méthodes de culture soit *in vivo* soit *in vitro* selon que les hybridomes sont réinjectés ou non chez la souris.

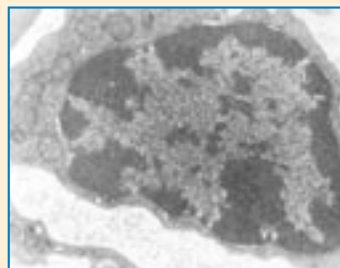
### Journée d'étude sur les alternatives à la production d'anticorps monoclonaux par la technique de l'ascite

Réunissant des intervenants issus des milieux académiques, industriels et de protection animale, une réunion d'information s'est tenue le 24 avril, dans les locaux du Ministère de l'Agriculture, à l'initiative du Comité de déontologie, en collaboration avec la BPAM. Le but de cette réunion était d'examiner les modalités de passage d'une production d'anticorps monoclonaux de l'*in vivo* vers l'*in vitro*.



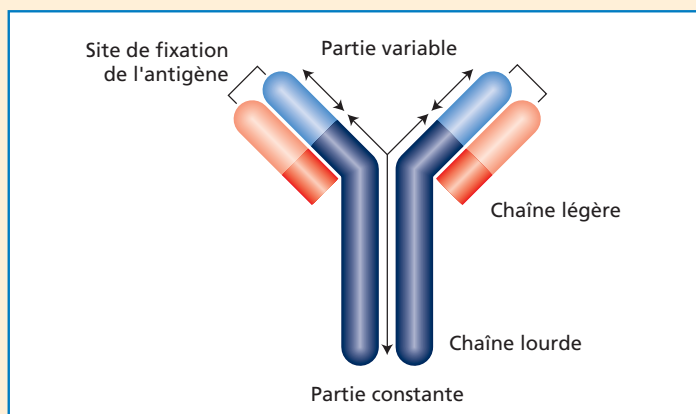
Lymphocyte en microscopie électronique

Prof. Y. Pourmay, Histology, FUNDP



Lymphocyte en coupe

Prof. J.-P. Brion, Histology, ULB



Structure d'un anticorps

## Méthode de l'ascite : efficacité, mais souffrance animale

La méthode faisant appel au vivant est la plus ancienne. Elle a été mise au point dans les années septante par Kohler et Milstein, prix Nobel de médecine en 1984. Elle consiste à injecter dans la cavité péritonéale d'une souris, les hybridomes sélectionnés, puis à récupérer, après une à deux semaines, les anticorps monoclonaux se trouvant dans le liquide d'ascite produit. Le principal désavantage de cette technique

réside dans son action traumatisante pour l'animal. Pour cette raison, de plus en plus de chercheurs recourent aux techniques de culture cellulaire *in vitro*.

### Méthodes alternatives : technologies cellulaires

De nos jours, plusieurs systèmes de culture *in vitro*, ont été développés<sup>1</sup>. Citons-en quelques-uns :

- la culture statique permettant d'obtenir des concentrations cellulaires importantes;
- le bio-réacteur en rotation;
- les cultures basées sur le principe des fibres creuses mimant les capillaires sanguins
- le système modulaire permettant de cultiver plusieurs souches d'hybridomes simultanément.

L'ensemble de ces techniques, malgré quelques inconvénients (technicité élevée, délais d'obtention des anticorps parfois plus long, coût élevé), offre comme principaux avantages d'éviter le recours à l'animal (remplacement partiel), permettant de surcroît d'obtenir des anticorps d'une grande pureté.

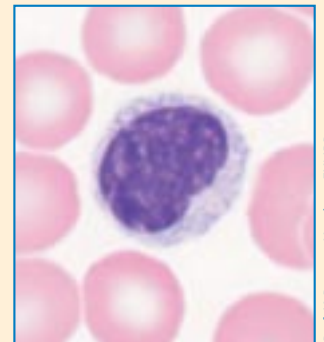
### *In vivo* versus *in vitro*

La méthode à l'ascite, largement utilisée par le passé, bien qu'efficace et peu coûteuse, peut induire une souffrance importante chez l'animal.

Les méthodes alternatives, technologies en plein développement, présentent de réels avantages : très bonne reproductibilité, rendement idéal pour des productions importantes, remplacement de l'animal de laboratoire.

Cependant, bien que dans certaines circonstances on doive encore recourir à l'animal pour obtenir des anticorps monoclonaux, dans la grande majorité des cas on peut s'en passer tout en préservant la qualité de la production.

La Plate-forme Belge des Méthodes Alternatives ne peut dès lors qu'encourager le recours aux techniques *in vitro* en remplacement de la méthode à l'ascite. De là, son engagement concret dans différents projets.



Frottis sanguin en microscopie optique : lymphocyte entouré d'érythrocytes

Prof. Y. Pourmay, Histology, FUNDP



Les tests ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) servent au diagnostic des maladies infectieuses en permettant la détection et le dosage des anticorps contre des antigènes connus.

<sup>1</sup> Pour de plus amples informations sur la production d'anticorps :

- ECVAM, Monoclonal Antibody Production, The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 23, in ATLA journal, volume 25, April 1997, pp. 121-137
- Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies Institute for Laboratory Animal Research. National Research Council, Monoclonal Antibodies Production, Washington DC, National Academy Press, 1999
- <http://altweb.jhsph.edu>
- <http://www.frame.org.uk/index.htm>

## ASSEMBLÉE PLÉNIÈRE DE LA BPAM

Judi 27 juin s'est tenue, dans les locaux de la Fondation Prince Laurent, une assemblée plénière scientifique de la BPAM. Les participants des quatre piliers de la BPAM, originaires de Belgique et d'autres pays de l'Union Européenne abordèrent les thèmes suivants :

- Enjeux éthiques de l'expérimentation animale;
- Production d'anticorps monoclonaux, de l'*in vivo* à l'*in vitro*;
- Utilisation d'animaux de laboratoire : statistiques belges 1996-2001.

Les différentes interventions furent suivies de séances de questions réponses, suscitant un dialogue constructif entre les participants. Intéressé(e) par les journées d'information organisées par la BPAM? N'hésitez pas à nous contacter.

## CONFÉRENCE DE LA COMMISSION EUROPÉENNE

"Conference on the State of the Art of Research-Replacement-Reduction and Refinement Alternatives to Animal Experimentation and Testing"

Les 9 et 10 juillet 2002 s'est tenue à Bruxelles une conférence consacrée aux 3 "R" à l'initiative de la Commission européenne et sous l'égide de Monsieur Ph. BUSQUIN, Commissaire européen à la Recherche. Parmi les thèmes abordés :

- Implication de la Commission dans les 3 "R"
- Derniers développements en génomique et en biotechnologie
- Le principe des 3 "R" : définition et pratique

# OPINION

## A propos des 3 "R"

Par R. Votion

La méthode des 3 "R" a été formulée à l'initiative de CHARLES HUME<sup>1</sup>, fondateur de la FEDERATION DES UNIVERSITES POUR LE BIEN-ETRE ANIMAL (Universities Federation for Animal Welfare – U.F.A.W.).

Il s'agissait d'entreprendre une étude sur les techniques humaines concernant l'utilisation des animaux d'expérience. William MS RUSSELL et Rex L. BURCH furent chargés de mener à bien cette recherche dont ils consignèrent les résultats dans leur livre "THE PRINCIPLES OF HUMAN EXPERIMENTAL TECHNIQUE"<sup>2</sup>, paru en 1959, il y a près d'un demi siècle. Les auteurs y définissent les trois principes fondamentaux devant

conduire à un plus grand respect de la vie animale et à un meilleur souci de leur souffrance, c'est-à-dire :

Le REMPLACEMENT (Replacement) de l'animal d'expérience par des méthodes d'investigation *in vitro*.

la REDUCTION (Reduction) du nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience.

La RATIONALISATION (Refinement) ou RAFFINEMENT de procédures expérimentales sur animaux afin de diminuer leurs souffrances.

Ignorés ou peu pris en considération pendant presque 30 ans, les trois principes semblent de nos jours avoir l'aval d'un nombre croissant des membres de la communauté scientifique. La plupart des organisations de protection animale les acceptent, souvent avec réticence, considérant que les 3 "R" constituent une étape importante vers l'abolition de l'expérimentation animale, sans en constituer toutefois un but en soi.

Le Professeur R. Votion est Président de l'APMA et Membre du Comité de gestion de la BPAM



A.P.M.A. :

Action Préventive contre le Martyre des Animaux de Laboratoire

De Burletlaan 4 • B-2650 Edegem

Tel: + 32 (0)3 449 49 08

Fax: +32 (0)3 448 26 63

apma@pandora.be • <http://www.apma.be>

<sup>1</sup> C.W. Hume. *The Vivisection Controversy in Britain*. In : C.W. Hume. (ed) *Man and Beast*. Potters Bar, Herts : UFAW, 1962, 55-70.

<sup>2</sup> W.M.S. Russell & R.L. Burch. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Edit. : Methuen, London 1959.

## Info pratique

Les numéros précédents de "BPAM-Info" sont disponibles auprès de la BPAM

Disponible auprès de la BPAM en version française ou néerlandaise (Prix : 5 €)