

Les approches complémentaires à l'expérimentation animale en agronomie et clinique vétérinaire : Solutions et limites

Marie-Hélène PERRUCHOT¹, Frédéric DESSAUGE¹

¹PEGASE, INRAE, Institut Agro, 35590, Saint-Gilles, France

Courriel : marie-helene.perruchot@inrae.fr

■ Le recours aux modèles animaux en recherche biologique soulève de nombreux questionnements de la société en général mais aussi chez les acteurs même de cette recherche. Au cours des siècles précédents la reconnaissance de l'animal comme un être sensible a pris beaucoup de temps. L'évolution des mentalités de la société depuis l'Antiquité jusqu'à nos jours a permis cette reconnaissance. Le cadre réglementaire de l'expérimentation animale a fortement évolué depuis une vingtaine d'années, associé à une réflexion éthique qui s'est traduite depuis 1990 par la mise en place de comités d'éthique. Des progrès restent encore à faire mais les applications de la Directive européenne de 2010 devraient contribuer encore à l'amélioration de la condition animale en recherche expérimentale. Le but de cette revue est d'exposer les différentes étapes ayant menées à la notion de « conscience animale », définie comme l'expérience subjective que les animaux ont de leur environnement, de leur propre corps et/ou de leurs propres connaissances, et à la nécessité de développer de nouveaux outils permettant de diminuer l'expérimentation animale.

Introduction

La perception de l'animal par l'homme a été fortement influencée par les théories philosophiques dont les plus importantes défendaient l'idée que c'est la conscience, autrement dit l'âme, qui différencie l'homme de l'animal. Ces théories n'ont cessé d'évoluer au cours des siècles et ont joué, depuis l'Antiquité, un rôle important dans la pratique expérimentale dont les hommes disposaient pour explorer le vivant et tout particulièrement le cerveau, considéré très tôt comme le siège de la conscience.

Le développement de méthodes complémentaires ou alternatives à l'expérimentation animale et permettant également de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation

animale dans la recherche et notamment dans la recherche agronomique répond à des préoccupations éthiques, sociétales mais aussi scientifiques. Le développement de nouvelles technologies (culture cellulaire, organ-on-chip, organoïdes) apporte des solutions expérimentales innovantes pour l'étude de la physiologie animale et des pathologies, avec leurs atouts et leurs limites. L'objectif de cette synthèse est dans un premier temps de faire l'historique de l'éveil à la conscience animale, par les courants philosophiques et biologiques qui durant des siècles se sont opposés sur le statut de l'animal, puis par la domestication de l'animal qui a été un élément principal de l'utilisation de l'animal par l'homme. Puis nous présenterons les différentes étapes de la législation sur la protection animale qui ont amenées à des lois visant à diminuer l'utilisation

animale à des fins scientifiques. Enfin, nous aborderons le développement des alternatives et expériences complémentaires à l'expérimentation animale de la découverte de la cellule à la création de mini-organes animaux.

1. Historique de l'éveil à la conscience animale et à l'éthique – La relation Homme-Animal

La conscience animale a longtemps été un sujet de recherche pour les scientifiques et les philosophes. Dès l'Antiquité des philosophes comme Aristote, ainsi que des Épicuriens et des Stoïciens estimaient que les animaux non humains n'étaient pas concernés par la justice (aucune sanction n'était

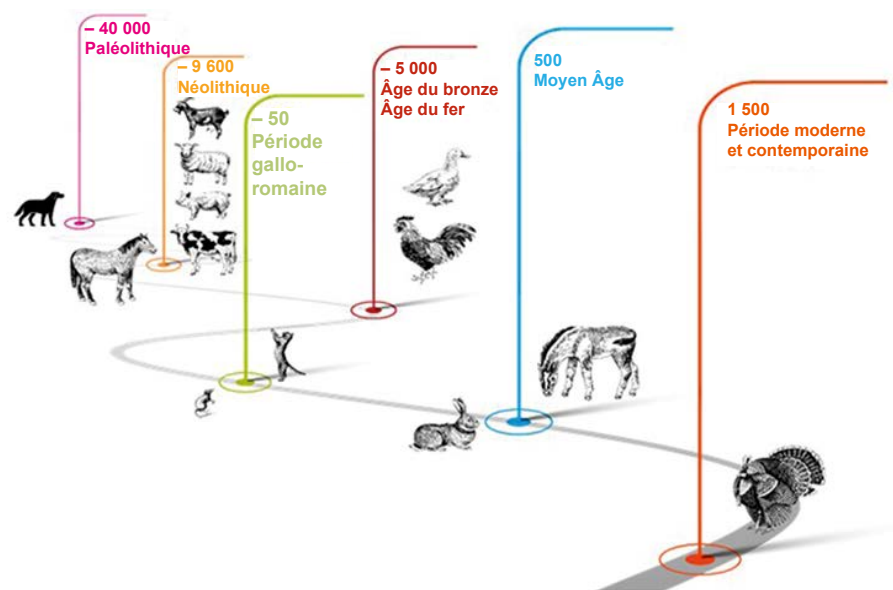
prévue en cas de mauvais traitement) parce que dépourvues de raison, alors que d'autres philosophes comme Porphyre (Porphyre, 1979) et Plutarque (Plutarque, 2002) affirmaient que les animaux étaient pourvus de sensibilité et devaient donc être respectés. Quelques siècles plus tard, René Descartes (Descartes, 1973) et Emmanuel Kant (Kant, 1986) affirmaient que l'animal était dépourvu de conscience, alors que Michel de Montaigne (De Montaigne, 1962), Jean-Jacques Rousseau (Guichet, 2002) et (Bentham, 1823) reconnaissaient à l'animal une sensibilité jusqu'à en faire des êtres sociaux. Ce n'est pourtant qu'à la fin du xx^e siècle que l'éthique animale (branche de la philosophie consacrée aux responsabilités morales des êtres humains à l'endroit des animaux d'autres espèces, appréhendés individuellement) s'est constituée comme une discipline philosophique à part entière – plus précisément en 1975, année de publication de l'ouvrage fondateur « Animal Libération », du philosophe australien Peter Singer (Singer, 2012). Peter Singer est ainsi un pionnier sur l'éthique animale en combinant une approche philosophique à des démonstrations scientifiques pour mettre en évidence la souffrance animale et l'utilisation abusive des animaux en expérimentation animale. Il amène ainsi une perspective pathocentriste, selon laquelle les individus ont une valeur non instrumentale parce qu'ils sont sensibles. Il rejette les notions de spécisme et d'utilitarisme, qui montrent l'animal comme un être ayant un statut inférieur aux humains. Deux expertises collectives ont été publiées sur la douleur et sur la conscience animale, associant des philosophes et des biologistes. Ainsi une première expertise scientifique collective menée par INRAE (Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement) pour le compte des ministères français de l'Agriculture et de la Recherche sur les « Douleurs animales en élevage » (Le Neindre, 2009) a été suivie en 2017 quand INRAE (*via* sa Direction de l'Expertise scientifique collective, à la Prospective et aux Études) s'est saisi de ces questions en réalisant une expertise scientifique collective sur la conscience animale, à la demande de l'Autorité européenne de sécurité alimentaire

(EFSA). Ces travaux ont amené à une clarification des concepts et méthodes d'analyse utilisés pour appréhender la douleur chez les animaux de rente. Ces travaux ont également permis de caractériser et identifier les situations de douleur. Ainsi, des interventions douloureuses peuvent être pratiquées sur les animaux pour répondre aux contraintes de certains systèmes d'élevage, mais également aux exigences de qualité organoleptique des produits ou de sécurité des travailleurs. Ainsi par exemple les conditions d'abattage ont été spécifiquement étudiées. Il est connu que le stress à l'abattage impacte très fortement la qualité de la viande (notamment chez le porc) et ces travaux ont permis d'identifier des solutions pour diminuer voire supprimer les douleurs et stress à l'abattage. Les résultats ont été présentés aux représentants des pays membres du réseau européen sur le bien-être animal et de l'EFSA le 11 mai 2017 à Parme (Italie) (Le Neindre *et al.*, 2017)

Un autre processus d'évolution de la prise en compte de la condition animale est la domestication animale, qui répond à une éthique utilitariste. La domestication de l'animal remonte

au paléolithique avec la domestication du chien, premier animal à avoir été domestiqué (– 40 000 ans) (Druzhkova *et al.*, 2013). Puis suivent d'autres espèces amenées par les colons au néolithique : la vache, le cochon, le mouton, la chèvre et le cheval (– 9 600 ans). Cette étape de la domestication va permettre l'essor de la vie agricole et de nouveaux modes alimentaires (et entraîne un changement de mode de vie de l'homme par la sédentarisation) (Gautier, 1991). Puis vers 5 000 ans avant notre ère, ce fut au tour des volatiles, en Asie, avec le poulet. Enfin, au Moyen Âge le lapin et l'âne furent domestiqués puis d'autres volatiles vers 1 500 de notre ère (Chansigaud, 2020). Toutes ces pratiques se font parfois au détriment de l'animal, qui y perd en diversité génétique, en capacité cérébrale et qui acquiert des traits parfois à son désavantage (Chanvallon, 2009). Le processus de domestication des espèces a entraîné des modifications physiologiques des animaux (diminution de l'agressivité, diminution du volume cérébral, changement de saisonnalité) et certaines pratiques ont été rendues dépendantes à l'homme comme la reproduction, la monte des chevaux (Chapouthier, 2009).

Figure 1. Relation Homme-Animal au travers des âges, incluant la domestication – car ce processus est à la base de « l'utilisation » de l'animal par l'homme.



Le chien a été le premier animal domestiqué et le loup gris serait l'ancêtre du chien domestiqué. 99 % de leur ADN est commun. Le cheval a été domestiqué non pas une fois, mais au moins deux. La première preuve de la domestication du cheval remonte à environ 5 500 ans, puis la seconde vers 2 200 ans avant notre ère. Puis eut lieu la domestication des herbivores notamment les bovidés, puis la poule vers 6 000 avant notre ère. Le chat aurait été domestiqué vers – 50 puis le lapin et l'âne au Moyen Âge. La dinde fut domestiquée plus tard vers 1 500.

2. Concilier protection animale, et besoin d'acquisition de connaissances : un corpus de réglementations en France et en Europe

La prise en compte des intérêts des animaux par le législateur est assez récente à l'échelle de l'histoire humaine. Tout d'abord en 1804 par la création du code civil par Napoléon dans lequel l'animal est considéré comme un « bien meuble » (art. 528) et sur lequel le propriétaire exerce un droit de propriété. En France, la préoccupation d'une protection de l'animal n'a reçu le soutien de la loi qu'en 1850, et encore de façon bien sommaire lorsque le 2 juillet l'Assemblée nationale législative vote la loi Grammont : « Seront punis d'une amende de cinq à quinze francs, et pourront l'être d'un à cinq jours de prison, ceux qui auront exercé publiquement et abusivement des mauvais traitements envers les animaux domestiques ». Le 14 mars 1861 la Cour de Cassation définit alors les animaux domestiques comme étant « des êtres animés qui vivent, s'élèvent, sont nourris, se reproduisent sous le toit de l'homme et par ses soins ». Une autre date importante est le 7 septembre 1959 avec le décret qui abroge et remplace la loi Grammont. Les mauvais traitements exercés envers les animaux sont également sanctionnés dans le cadre privé. La loi du 19 novembre 1963 crée le délit d'actes de cruauté puis la loi du 10 juillet 1976 fixe les principes fondamentaux de la protection animale : i) l'animal est un être sensible, qui doit être placé dans des conditions compatibles avec ses impératifs biologiques ; il est interdit d'exercer des mauvais traitements envers les animaux ; il est interdit d'utiliser des animaux de façon abusive (Code rural et de la pêche maritime, article L. 214-1 à L. 214.3).

Le Conseil de l'Europe s'intéresse à la protection des animaux (1960-1970) en mettant en place des conventions protégeant les animaux d'élevage, d'expérimentation et domestiques. En 1987, la Convention européenne pour la protection des animaux de compagnie

visé de façon générale le bien-être des animaux domestiques. Et en 1997 le Traité d'Amsterdam considère l'animal comme « un être sensible pour lequel la mise en œuvre de la politique communautaire dans les domaines de l'agriculture, des transports, du marché intérieur et de la recherche doit prendre en compte ses exigences de bien-être ». En 1999, suite à une nouvelle loi de protection animale, le code civil français est modifié afin que les animaux, tout en demeurant des biens, ne soient plus assimilés à des choses.

Par la suite, l'article 521-1 du code pénal « protège l'animal dans sa nature d'être sensible en condamnant lourdement les sévices graves commis envers les animaux placés sous responsabilité humaine ». En 2005, un rapport, missionné par le garde des Sceaux, recommande « la reconnaissance dans le code civil de la qualité d'être vivant doué de sensibilité de l'animal, et de déduire de cette qualification de base le régime juridique qu'il convient d'adopter à son égard ». Puis en septembre 2010, dans la directive européenne sur l'expérimentation animale apparaît à nouveau la notion de sensibilité : « Les animaux devraient donc toujours être traités comme des créatures sensibles ». Une proposition de loi relative à la protection animale est effectuée le 13 novembre 2012 dans laquelle figure l'Article 515-14 stipulant que « Les animaux sont des êtres vivants doués de sensibilité. Ils doivent être placés dans des conditions conformes aux impératifs biologiques de leur espèce et au respect de leur bien-être ». Le 16 avril 2014 a lieu le premier passage du projet de loi relatif à la modernisation et à la simplification du droit et des procédures dans les domaines de la justice et des affaires intérieures dans l'hémicycle

de l'Assemblée Nationale. Les députés votent l'amendement Glavany qui inclut l'article 515-14 comme suit : « Les animaux sont des êtres vivants doués de sensibilité. Sous réserve des lois qui les protègent, les animaux sont soumis au régime des biens corporels ». Le 30 octobre 2014 les députés adoptent le texte de loi, y compris la disposition qui reconnaît aux animaux la qualité d'êtres vivants doués de sensibilité. Les animaux sont reconnus comme des êtres vivants doués de sensibilité. Le régime juridique (biens meubles ou immeubles) reste inchangé et les règles régissant leur propriété continuent à s'appliquer.

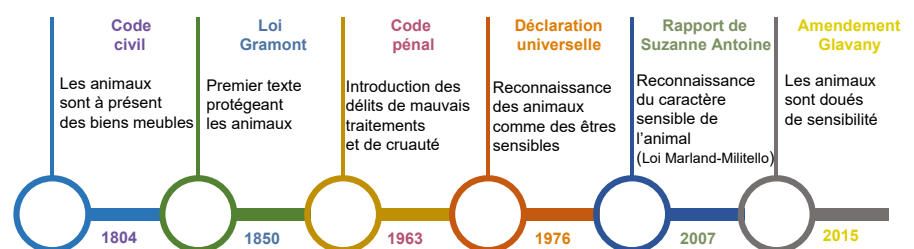
Cette mesure symbolique est perçue positivement par les associations animalières et les amoureux des animaux qui le voient comme un premier pas vers l'évolution de la place accordée aux animaux dans notre société. <https://www.fondation-droit-animal.org/informations-juridiques/textes-relatifs-a-lanimal/>

Puis récemment la Loi du 30 novembre 2021 est votée visant à lutter contre la maltraitance animale et conforter le lien entre les animaux et les hommes.

■ 2.1. Comment repositionner l'élevage dans cette évolution ?

La domestication de l'animal a fait de l'animal d'élevage un animal « utilitaire » et l'élevage actuel découle de ce processus millénaire. Actuellement, les objectifs intentionnels de la domestication ou de l'amélioration des races domestiques concernent essentiellement la production (rarement le travail produit par les animaux). Ce sont l'adaptation aux conditions d'élevage,

Figure 2. Les étapes-clés de la réglementation sur la protection animale



Frise chronologique des étapes-clés des recommandations et lois promulguées en France depuis 1804 jusqu'à l'amendement Glavany de 2015.

la prolificité, la vitesse de croissance, et souvent la qualité de la chair ou celle d'autres produits comme le lait ou la laine. Les premiers registres montrant une formalisation de la sélection des animaux par lignées datent du ^{xvi}^e siècle av. J.-C. (Sanchez *et al.*, 2000). La sélection moderne nécessite une évaluation objective des sujets et une organisation rigoureuse des programmes d'élevages, pour obtenir une amélioration des performances des lignées en fonction d'objectifs déterminés. La forme la plus poussée de domestication correspond à l'élevage intensif, où l'éleveur fournit tout ce qui est nécessaire au développement des animaux, pour maximiser leur production ou permettre leur élevage sur des surfaces réduites. En élevage, l'intensification qui accompagne la modernisation tend à amoindrir l'interaction directe entre éleveur et animal (Fiorelli *et al.*, 2012).

Cependant depuis plusieurs dizaines d'années la relation homme – animal et le bien-être des animaux d'élevage est devenu un sujet de grande importance en agronomie (Boivin *et al.*, 2012).

■ 2.2. L'expérimentation animale en question

L'utilisation d'animaux dans le but d'acquérir et d'augmenter les connaissances des processus biologiques, physiologiques et médicales remonte à l'antiquité. Le droit romain interdisant la dissection de cadavres humains, on peut attribuer à Galien (environ 130-200 après J.-C.) la pratique systématique de l'expérimentation animale, principalement sur des cochons et des singes. Les progrès de la connaissance scientifique ont amené à une meilleure connaissance de la manière dont « fonctionnent » les corps des animaux et des hommes. Ces progrès sont d'ailleurs fondés sur la recherche biologique expérimentale elle-même, dont les principes ont été décrits au ^{xix}^e siècle par Claude Bernard (Bernard, 1952), et dont les bases sont postcartésiennes : les corps vivants, systèmes matériels, sont analysables et connaissables par l'expérimentation. Or ces progrès de la connaissance scientifique ont démontré l'extraordinaire

ressemblance du fonctionnement des corps animaux et humains. Le développement du recours aux animaux en recherche biomédicale a été marqué au ^{xix}^e siècle par Claude Bernard, fervent défenseur de la méthode expérimentale. Dans « Introduction à l'étude de la médecine expérimentale » publiée en 1865, il écrivait : « On ne pourra arriver à connaître les lois et les propriétés de la matière vivante qu'en disloquant les organismes vivants pour s'introduire dans leur milieu intérieur ». Cette méthode expérimentale annonce une nouvelle ère de la médecine. Et elle a permis à Claude Bernard de faire des découvertes majeures. La plupart de ses expérimentations passaient par la vivisection. « Ce qui lui a valu quelques déboires avec la toute nouvelle Société Protectrice des Animaux (SPA) créée en 1845 », s'amuse Pierre Corvol, « Même sa femme et ses filles, farouches militantes de la cause animale, finiront par se détourner de lui » (Corvol, 2012).

En dépit de l'ancienneté de cette pratique de l'expérimentation animale, aucune réglementation, tant législative que morale ne sera mise en place avant le ^{xx}^e siècle. Depuis la réforme du code pénal en 1994, ces actes de vivisection de l'animal sont répréhensibles et relèvent de la catégorie « autres crimes et délits ». De plus, les peines relatives à la maltraitance animale viennent d'être renforcées dans la loi EGALIM de 2018. En effet, il existe une différence significative à prendre en compte entre la maltraitance (non justifiée donc non acceptable) et l'utilisation à des fins scientifiques (approche utilitariste, induisant une douleur/souffrance supérieure à celle d'une aiguille) évaluée par un comité d'éthique Il est devenu impératif de garantir aux animaux encore utilisés pour des raisons légitimes un niveau de protection et de bien-être aussi élevé que le permettent les objectifs de l'expérience. De plus il est important de connaître l'évaluation du ratio entre les dommages sur les animaux et les avantages escomptés liés à l'expérimentation.

Le souci moral partagé par de nombreuses personnes de ne pas faire souffrir les animaux, s'est traduit d'une part par la création de structures

associatives (la Société Protectrice des animaux créée en France en 1845, et le parti Animaliste fondé en 2016, premier parti politique français consacré à la défense des animaux) d'autre part par l'introduction dans le code pénal d'une loi visant à protéger les animaux puis par l'introduction dans le code pénal en 1850 (loi Grammont).

En matière d'expérimentation animale, la question de la gestion de la douleur a amené à l'établissement de la règle des 3S. Les experts du collectif d'experts INRAE suggèrent de pratiquer avec la règle des 3S : supprimer, substituer, soulager. En effet, la première question est de savoir si l'acte, potentiellement douloureux, est réellement nécessaire, puis, dans l'affirmative, de le réaliser par la méthode la moins douloureuse (Le Neindre *et al.*, 2009). Enfin, si cette dernière occasionne toutefois de la douleur, il convient de la soulager à l'aide de l'analgésie précoce, multimodale et adaptée : *i*) supprimer la source de douleur lorsque celle-ci n'apporte aucun avantage pour les animaux et pour les éleveurs ; *ii*) remplacer une technique source de douleur par une autre méthode ; *iii*) soulager la douleur inévitable par des traitements pharmacologiques.

3. Les 3R et les 3S : nouvelles étapes !

■ 3.1. La règle des « 3 R », développement des méthodes alternatives pour répondre aux préoccupations sociétales autour d'une démarche éthique en expérimentation animale

En 1959, Russell et Burch ont décrit le principe des « 3 R » – Remplacer, Réduire, Affiner – pour la recherche utilisant des animaux (Tannenbaum et Bennett, 2015). Ce principe recommande de substituer l'utilisation d'animaux à plus forte conscience (vertébrés vivants) par des formes de vie plus primitives ou avec des expérimentations *in vitro* et des simulations informatiques. Le principe de réduction recommande que la recherche et les

procédures doivent être effectuées avec aussi peu d'animaux que possible, alors que le principe de raffinement suggère que les techniques utilisées doivent diminuer leur douleur et leur détresse à toutes les étapes de l'étude (Miziara *et al.*, 2012 ; Petroianu, 1996).

■ 3.2. Les « méthodes alternatives » à l'expérimentation animale

La terminologie « méthodes alternatives » a été introduite en 1978 par David Smyth (Smyth, 1978). Elle regroupe les méthodes permettant de satisfaire un ou plusieurs principes des « 3R » (Remplacer – Réduire – Raffiner).

En 2012, l'OPAL (association fondée en 1968 sur l'utilisation de l'animal en expérimentation animale) organisait un colloque autour d'un 4^e R : « Responsabilité de tous les acteurs de l'expérimentation animale ». Les acteurs de la recherche animale se doivent d'appliquer les principes éthiques afin de réaliser une recherche de qualité tout en préservant au mieux les animaux. Les attentes sociétales en matière de recours aux méthodes alternatives en expérimentation apparaissent en majorité raisonnées et cohérentes avec l'avancée de la recherche, l'analyse des enjeux et les évolutions réglementaires.

■ 3.3. Informations officielles sur les méthodes alternatives

Le Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM) : <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/> est un laboratoire de référence européen. De plus, la plate-forme nationale pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale (FRANCOPA) est dédiée au développement et à la diffusion de méthodes alternatives en expérimentation animale créée en 2007 : <http://www.francopa.fr/web/francopa?page=home&out=txt&language=fr>. Enfin le FC3R (France Centre 3R) a été créé en 2021 pour soutenir l'application des règles qui découlent du principe des 3R à la demande du ministère de l'enseignement supérieur,

de la Recherche et de l'Innovation, sous la forme d'un Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS). Il est doté de missions et de moyens d'actions conséquents. Cette structure a l'ambition d'être reconnue en France et en Europe comme référence et point de contact pour toutes les questions relatives aux 3R, dans la recherche publique comme privée FC3R, constitué en France, a pour membres fondateurs du GIS sont l'Inserm, le CNRS, INRAE, l'Inria, le CEA, l'Institut Pasteur de Paris, la CPU et Udice. <https://presse.inserm.fr/creation-dun-groupement-dinteret-scientifique-referance-francaise-pour-toutes-les-questions-relatives-aux-3r-2/44037/>.

Les objectifs du FC3R sont : d'obtenir une réduction notable du nombre d'animaux utilisés en expérimentation, notamment par des approches multimodales longitudinales, assurer un meilleur remplacement par des modèles invertébrés ou des approches complémentaires notamment *in vitro* ; i) s'assurer d'un raffinement fondé sur des pratiques innovantes ; ii) s'assurer de la formation à une pratique rigoureuse et responsable, conforme au principe des 3R, de tout étudiant, et toute étudiante et/ou nouvel entrant, nouvelle entrante amenée à utiliser des animaux à des fins scientifiques ; il est important de rappeler que tout utilisateur d'animaux pour l'expérimentation doit être reconnu compétent par l'autorité (ce qui suppose une formation initiale et une formation continue) ; iii) positionner le FC3R comme un acteur incontournable en France et en Europe sur le développement des méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux et sur les autres questions relatives aux 3R.

Un ouvrage majeur sur les alternatives à l'expérimentation animale permettant d'expliquer les avancées en la matière a été publié très récemment et se révèle un outil permettant d'avoir une meilleure visibilité sur le sujet (Marano *et al.*, 2020).

L'Organisation Non Gouvernementale allemande « Doctors Against Animal Experiments » a créé une base de données sur les méthodes alternatives à l'expérimentation animale

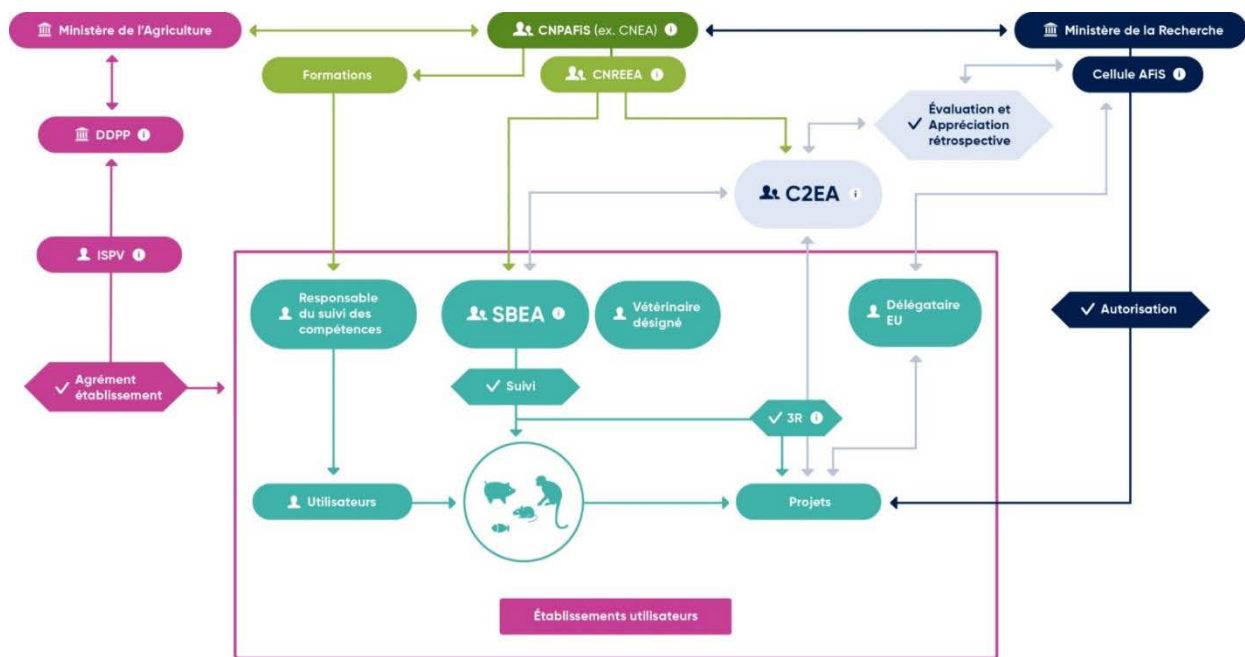
pour la recherche. La base de données s'appelle NAT Database (NAT pour Non Animal Technologies) et est disponible en anglais et en allemand. Les critères de recherche sont les suivants : domaine de recherche concerné, méthode, année et pays de publication.

■ 3.4. Le tournant politique en éthique animale

Conformément aux principes de la directive Européenne 2010/63/UE, la France a mis en place un dispositif institutionnel d'encadrement de la recherche utilisant des animaux à des fins scientifiques. La naissance des comités d'éthique démarre au Canada en 1968, puis le lancement en France date de 1980 (industrie et armée), puis 2001 dans la recherche publique. Le ministère chargé de la Recherche délivre les autorisations de projets utilisant des animaux, après évaluation éthique favorable du projet par les Comités d'Éthiques en Expérimentation Animale (C2EA) qui procèdent à une évaluation éthique sur la base de la détermination d'une balance coût/bénéfice entre les avantages potentiels du projet et les dommages prévus pour les animaux. En France deux autorités Agriculture et Recherche prédominent. L'Agriculture a une mission régaliennne de contrôle des structures et du respect de la réglementation (agrément, conformité des projets, compétences des personnes). Cette mission est déléguée à la DGAL et aux DDPP. La Recherche s'occupe de l'évaluation éthique et autorisation des projets. La Commission Nationale de Protection et d'utilisation d'Animaux à des Fins Scientifiques (CNPAFIS) est placée sous l'égide des 2 ministères (décret 2013/118).

Ceci garantit ainsi la conformité réglementaire des infrastructures et du fonctionnement des établissements, en particulier celui des Structures chargées du Bien-Être Animal (SBEA) qui assurent le suivi opérationnel des projets autorisés, la diffusion et la promotion de la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) au sein des établissements. <https://www.sbea-c2ea.fr/lanimal-dans-la-recherche/>

Figure 3. Dispositif mis en place en France conformément aux principes de la directive Européenne 2010/63/UE.



Dispositif institutionnel d'encadrement de la recherche utilisant des animaux à des fins scientifiques mis en place par la France conformément aux principes de la directive Européenne 2010/63/UE.

4. Concrètement quelles sont les alternatives à l'expérimentation animale ?

Le dialogue qui s'est instauré entre ces comités et les chercheurs a permis la valorisation de principes jusqu'alors ignorés tels que les 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) qui ont permis l'amélioration des conditions expérimentales, la diminution progressive du nombre d'animaux grâce à une utilisation raisonnée et le remplacement de l'animal par des techniques *in vitro*, et *in silico* notamment dans à différents stades de recherche.

■ 4.1. Les approches *in vitro*

Le développement des sciences biologiques n'aurait pas été possible sans l'une des plus grandes inventions : les microscopes. Aux ^{xvi}^e et ^{xvii}^e siècles,

Encadré 1. Approches *In vitro*.

Approches *In vitro*. Se dit des réactions chimiques, physiques, immunologiques ou de toutes les expériences et recherches pratiquées au laboratoire, en dehors d'un organisme vivant. (On réalise *in vitro* des cultures de tissus, la synthèse d'hormones...)

deux pays, les Pays-Bas et l'Italie, ont joué un rôle crucial dans la construction et l'utilisation des microscopes et télescopes. Aux Pays-Bas, vers 1590, Hans Janssen et son fils inventent un microscope construit de deux lentilles convexes. Le physicien anglais Hooke a publié en 1665 le premier ouvrage important sur la construction du microscope, ses composants et ses observations microscopiques. Dans sa micrographie, il a illustré les structures microscopiques de nombreux échantillons biologiques (insectes, plantes, éponges, bryozoaires, fossiles...), observés au microscope et décrit les unités microscopiques. Les « cellules » ou « pores », comme il appelait les petits compartiments d'une tranche de liège (parois épaissies de cellules mortes) ont été choisies pour désigner ces unités microscopiques. Bien que Robert Hooke ait utilisé différemment le terme « cellule » par rapport aux biologistes ultérieurs, le terme « cellule » d'aujourd'hui vient directement de Hooke's Micrographia (Hooke, 1665). À la fin du ^{xix}^e siècle, Wilhelm Roux (1885) a démontré qu'il est possible de maintenir des cellules vivantes (à partir de la plaque neurale d'embryons de poulet) à l'extérieur du corps dans un tampon salin pendant quelques jours (Sander, 1991). L'embryologiste américain Ross

Granville Harrison (1870-1959) a développé les premières techniques de culture cellulaire *in vitro* au début du ^{xx}^e siècle (Souza *et al.*, 2016). Les expérimentations de Harrison ont rendu la vie cellulaire « visible » par développement de techniques de visualisation entre lame et lamelle de ses cultures. Dans son article de recherche "Observations on the Living Developing Nerve Fiber", il a décrit une méthode de maintien des cellules nerveuses et de développement des fibres *ex vivo* (Harrison, 1907). Malheureusement, les observations de Harrison ont été limitées dans le temps par des contaminations bactériennes. Pour cette raison, Harrison a introduit des techniques aseptiques dans le travail avec des cultures cellulaires. La verrerie a été flambée, l'équipement chirurgical (aiguilles, ciseaux et forceps) a été bouilli et les tissus / papiers filtres ont été passés à l'autoclave. La technique aseptique a permis d'obtenir des préparations stériles pouvant être maintenues *in vitro* pendant plus de cinq semaines. En raison de ces changements dans la préparation des tissus stériles, Harrison a pu mettre en évidence divers stades de développement cellulaire de manière continue au fil du temps (Nicholas, 1961). Grâce au développement de sa technique, Harrison a mis en lumière d'énormes

possibilités d'application de la culture cellulaire et tissulaire non seulement comme outil dans les études de bactériologie, d'embryologie, de physiologie ou d'histologie, mais aussi pour la production d'anticorps monoclonaux, de vaccins et de médicaments (Rodriguez-Hernandez *et al.*, 2014). Par la suite, une expérience d'Alexis Carrel (prix Nobel de physiologie et de médecine en 1912) qui a beaucoup marqué son époque a été le cœur de poulet qu'il a fait battre *in vitro*, dans un liquide nutritif, pendant une durée de plusieurs décennies (âge que n'atteint aucun poulet) (Soupault, 1952). Il ouvrait ainsi la voie à deux thèmes de recherches : *i*) la conservation d'organes vivants à des fins éventuelles de greffes ; la limite exacte de la durée de vie des différents organes.

■ 4.2. Les lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont des cellules immortalisées généralement par transfection, qui se multiplient par mitose et représentent une population homogène. L'intérêt majeur est qu'elles peuvent être maintenues en culture à très long terme.

En 1925, l'ATCC (American Type Culture Collection), centre mondial de ressources biologiques, est fondée lorsqu'un comité de scientifiques reconnaît le besoin d'une collection centralisée de micro-organismes que les scientifiques du monde entier peuvent utiliser pour mener leurs recherches afin de faire progresser la science de la microbiologie. Les collections se sont ensuite étendues aux lignées cellulaires et l'ATCC est devenue une organisation de normalisation ainsi que le principal développeur et fournisseur de lignées cellulaires et de micro-organismes authentifiés. En 1927, le premier catalogue ATCC est publié. La deuxième édition deux ans plus tard compte 650 nouvelles cultures. <https://www.atcc.org/>. La première lignée cellulaire, la lignée cellulaire « L », a été établie par Earle en 1948. Cette lignée cellulaire était dérivée de tissu sous-cutané de souris et présentait une morphologie assez différente du tissu original (Marquis, 2012).

Dans les années 50 et 60, d'autres lignées cellulaires diploïdes ont été

développées comme HeLa, MRC-5 et WI-38 à partir de tissus humains (Rodriguez-Hernandez *et al.*, 2014). La lignée cellulaire s'appelait HeLa (dérivé du nom du patient – Henrietta Lacks), a été cultivée pendant un an et en 1952, le Dr Gey et ses collègues ont publié les premiers résultats sur cette lignée (Gey *et al.*, 1952). Il a été démontré que les cellules de la lignée HeLa se développaient dans divers milieux – milieu de plasma de poulet, extrait d'embryon de bovin et sérum de cordon placentaire humain. La lignée cellulaire HeLa établie par Gey a donné à Jonas Salk et John Enders la possibilité de développer des cultures de poliovirus dans un système tissulaire non nerveux. Le virus de la poliomyélite a également été propagé avec succès dans des cultures de cellules HeLa par le Dr Gey (Lucey *et al.*, 2009). Les cellules HeLa sont devenues la ressource la plus populaire et la plus précieuse pour les études sur le cancer (Meechan et Wilson, 2006).

■ 4.3. Cependant aujourd'hui les principales limites et inconvénients de l'utilisation des lignées cellulaires sont :

- Les aberrations génétiques des lignées cellulaires liées à l'augmentation du nombre de passages,
- La dérive génotypique et phénotypique dans les lignées, notamment déposées dans les banques de cellules depuis de nombreuses années,
- Les différentes modalités de culture de cellules tumorales et cancéreuses (2D et 3D),
- La contamination croisée des cultures cellulaires avec la lignée cellulaire HeLa (il a été rapporté qu'un grand nombre de lignées cellulaires cancéreuses sont contaminées de manière croisée),
- Les conditions de culture peuvent modifier la morphologie, l'expression des gènes et plusieurs voies cellulaires,
- Les infections à mycoplasmes pouvant modifier les propriétés de la culture, (Edmondson *et al.*, 2014).

■ 4.4. Les cellules souches

L'une des avancées les plus remarquables a eu lieu en 1957 lorsque la première greffe de moelle osseuse humaine a été tentée par le Dr Edward Donnall Thomas, un médecin-chercheur travaillant à Seattle à l'époque qui a ensuite remporté le prix Nobel en 1990 pour son travail (Storb, 2012). Grâce à ses recherches en immunologie, Good a pu réaliser la première greffe de moelle osseuse allogénique. La greffe de moelle osseuse est une forme de greffe de cellules souches hématopoïétiques dans laquelle des cellules souches hématopoïétiques sont injectées à un patient pour traiter diverses maladies du sang, y compris certaines maladies auto-immunes et héréditaires, et le cancer. Puis le Dr Robert A. Good a réalisé la première greffe de moelle osseuse sur un enfant souffrant d'un déficit immunitaire en 1968. Le garçon a ainsi reçu de la moelle osseuse de sa sœur et a continué à vivre jusqu'à l'âge adulte (O'Reilly, 2003).

En 2006, Shinya Yamanaka de l'Université de Kyoto au Japon a obtenu des cellules de type embryonnaire à partir de cellules adultes, évitant tout dilemme éthique découlant de la nécessité de détruire un embryon (Takahashi et Yamanaka, 2006). Capable de reprogrammer des cellules adultes spécialisées en cellules pluripotentes en insérant 4 gènes clés (Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc), il a pu former ce que l'on appelle aujourd'hui des « cellules souches pluripotentes induites » (iPS). Les iPSC sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier en plusieurs types cellulaires (Doi *et al.*, 2009).

En 2012, le prix Nobel de physiologie et médecine a été décerné à John B. Gurdon (pour les découvertes qui ont prouvé la nature réversible de la spécialisation cellulaire) et à Shinya Yamanaka (pour la reprogrammation de cellules murines matures en cellules immatures) (Trounson et DeWitt, 2013). Ces deux découvertes sont d'une grande importance dans de nombreux domaines de la médecine, comme l'oncologie et la médecine régénérative. Il a été rapporté que les cellules souches embryonnaires ont été utilisées avec succès dans la

réparation du cartilage, la réparation des nerfs périphériques ou la thérapie régénérative cardiaque. De plus, les cellules souches mésenchymateuses ont été utilisées dans certains types de thérapies, par exemple, les transplantations autologues ou les thérapies contre les maladies hématopoiétiques (Sykova et Forostyak, 2013).

■ 4.5. Les nouveaux systèmes de culture cellulaire : État des lieux, avantages et limites actuelles

a. Les organoïdes

Les organoïdes ne sont pas de simples cultures cellulaires mais sont des structures 3D dérivées de cellules souches ou de cellules progénitrices qui recréent des aspects importants de l'anatomie 3D de l'organe en miniature et qui peuvent posséder une ou plusieurs fonctions tissulaires de l'organe (Rossi *et al.*, 2018). Les organoïdes sont définis

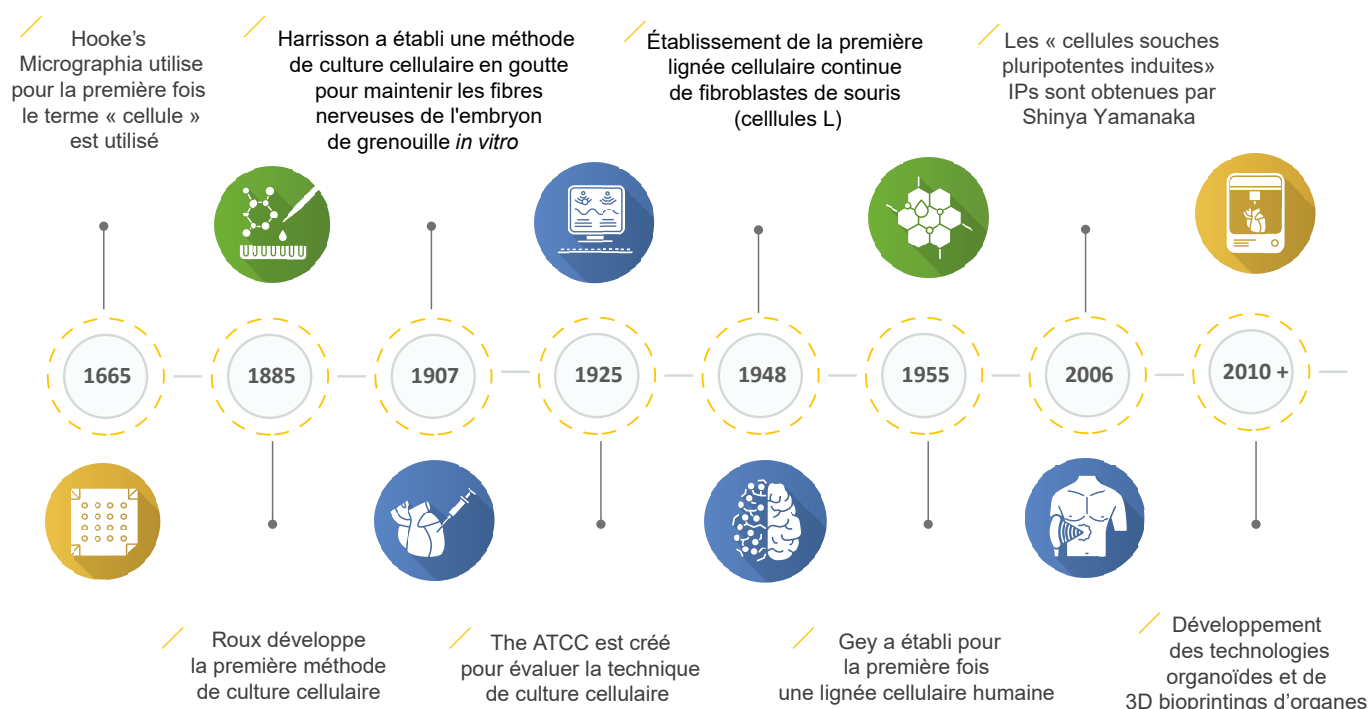
par une auto-organisation cellulaire tridimensionnelle *in vitro* constituée de plusieurs types de cellules exerçant des fonctions présentes normalement dans l'organe *in vivo*.

Les organoïdes peuvent être générés à partir de cellules souches adultes (CSA) (Sato *et al.*, 2009), de Cellules Souches Embryonnaires (CSE) (Eiraku *et al.*, 2008) ou à partir de cellules iPSC (Takahashi et Yamanaka, 2006). Pour les animaux de ferme, les organoïdes pourraient être utilisés pour le phénotypage *in vitro*, en testant les caractéristiques *in vitro* des organoïdes qui peuvent être un indicateur des traits d'intérêt (Archibald *et al.*, 2020). D'autres applications sont possibles : étude des pathologies, des mécanismes de fonctionnement des tissus en réponse à certains facteurs... Les modèles actuellement développés faisant appel aux espèces d'intérêt agronomique sont principalement ceux liés au développement embryonnaire

et à la relation fœto-maternelle, à la physiologie de tissus comme le tissu musculaire, le tissu adipeux, la glande mammaire, le foie, à l'interaction tissu-microbiote, surtout au niveau intestinal, mais potentiellement au niveau de la peau, du poumon et de tout tissu en contact avec un microbiote, à l'interaction hôte-pathogène à la fois bactérienne et virale pour différents tissus comme *l'intestin*, la peau, le poumon, le cerveau.

En face de ces modèles qui utilisent des animaux d'intérêt agronomique, le développement des organoïdes a d'abord été réalisé chez le rongeur et l'Homme et l'application de ces nouveaux modèles *in vitro* aux animaux d'élevage ouvre des opportunités pour réduire l'expérimentation animale et de nouvelles perspectives d'approches prédictives pour de nombreuses espèces (lapins, volailles, monogastriques, ruminants...). Un numéro

Figure 4. Les étapes-clés du développement des cultures cellulaires de la découverte de la cellule au développement de mini-organes.



La découverte du microscope en 1665 a mis en évidence la présence des cellules et leur étude au cours des siècles a permis de développer de nouveaux outils de recherche qui encore aujourd'hui sont en perfectionnement.

spécial de Veterinary Research : <https://www.biomedcentral.com/collections/organoids-animals> est paru en 2021 montrant le fort développement de ces techniques en agronomie (Archer *et al.*, 2021 ; Baquerre *et al.*, 2021 ; Beaumont *et al.*, 2021 ; Bourdon *et al.*, 2021 ; Dessauge *et al.*, 2021 ; Kar *et al.*, 2021 ; Orr *et al.*, 2021 ; Pain *et al.*, 2021 ; Pain, 2021 ; Souci et Denesvre, 2021 ; Vermeire *et al.*, 2021). Ainsi pour le muscle par exemple, Kim *et al.* (2020) ont développé un système de bio-impression 3D innovante à base de cellules matrice extracellulaire décellularisée permettant d'obtenir *in vitro* des fonctions et propriétés mécaniques des tissus musculaires squelettiques (Kim *et al.*, 2020).

b. Le 3D bioprinting

Le développement de la MEC (matrice extracellulaire) permet d'obtenir des interactions cellule-cellule et MEC-cellule dans les cultures. En utilisant des cultures cellulaires 2D, les chercheurs n'ont pas été en mesure d'imiter l'état *in vivo*. Les cultures monocouches classiques présentent diverses limitations, par exemple la perte de l'architecture spécifique des tissus. Le développement de nouvelles techniques a permis d'améliorer le microenvironnement des cultures cellulaires, par exemple, les modèles de culture cellulaire tridimensionnels (3D). Cette technique a permis

Encadré 2. Le 3D bio-printing.

Le 3D bioprinting ou bio-impression 3D fait référence à un type de fabrication « additive », une technique de fabrication couche par couche qui est née à l'origine d'un besoin fabrication « à façon » rapide et qui a depuis évolué vers une méthode de fabrication rapide et personnalisable dans de nombreux domaines. La technologie de bio-impression 3D permet une flexibilité dans le choix des matériaux et le paradigme de conception — dans le contexte de l'ingénierie tissulaire, la capacité d'incorporer des biomatériaux et des cellules permet intrinsèquement la bio-impression 3D. Alors que la bioimpression 3D devient plus omniprésente, davantage de recherches sur les techniques de bioimpression ont émergé, permettant la fabrication d'un large éventail de constructions biocompatibles, de tissus encapsulés dans des cellules et de modèles d'organes. (Xiang *et al.*, 2022)

de réaliser des cultures cellulaires non adhérentes et adhérentes. Pour les non adhérentes, l'agrégation cellulaire peut être obtenue en utilisant des boîtes à faible attachement (Ultra Low Attachment) et/ou recouvertes d'agarose et de méthacrylate de polyhydroxyéthyle (pMEMA). Les cultures 3D des cellules adhérentes peuvent être obtenues en utilisant des matériaux poreux pour des scaffolds préfabriqués qui favorisent l'adhérence des cellules. Le format de culture 3D offre une possibilité unique d'analyser et de comprendre la croissance, la migration et l'organisation cellulaire (Mandrycky *et al.*, 2016).

c. La technique de culture 3D (organoïdes et 3D bioprinting) est basée sur l'idée de mimer et présente de nombreux avantages

- Ce modèle *in vitro* plus représentatif présente des caractéristiques biochimiques et morphologiques spécifiques à l'état *in vivo*,

- La culture 3D assure les interactions cellule-cellule et cellule-MEC (signaux mécaniques et biochimiques) qui sont essentielles pour différents processus tels que la différenciation et la prolifération,

- Les interactions entre les cellules spécifiques du tissu et le système sanguin sont également importantes. Le développement de technologies permettant de vasculariser les cultures 3D est essentielle dans de nombreuses études et est en expansion en rapport avec ce point. Les stratégies de vascularisation *in vitro* peuvent être classées en méthodes de modélisation et d'auto-organisation (Nashimoto *et al.*, 2017).

- Ce type de cultures assure une architecture tissu-spécifique plus précise,

- Différents types de systèmes de culture cellulaire 3D, par exemple, sphéroïdes 3D sont cultivés sur matrice, sphéroïdes 3D cultivés dans la matrice (culture 3D basée sur un scaffold), sphéroïdes 3D cultivés en suspension, cultures 3D sans scaffold. Les sphéroïdes contrairement aux organoïdes sont un

amas simple de cellules, provenant par exemple d'hépatocytes, de tissus nerveux, de cellules du muscle squelettique ou de glandes mammaires. Ils ne nécessitent pas d'échafaudage pour former des cultures 3D ; Les cellules s'assemblent spontanément en amas les unes avec les autres. Ils ne peuvent pas s'auto-assembler ou se régénérer, et ne sont donc pas aussi avancés que les organoïdes.

d. Limites et inconvénients

- Dans certaines cultures 3D, le détachement des cellules est difficile,

- Certains systèmes existants ne parviennent pas à imiter les caractéristiques biomécaniques des tissus *in vivo* car ils conservent une condition statique,

- Pour les systèmes de culture sur scaffolds, la reproductibilité entre les différents lots n'est pas satisfaisante,

- Dans les scaffolds synthétiques à base de PolyEthyleneGlycol (PEG), le PEG est compatible avec les cellules mais les cellules qui sont incluses ne sont pas capables de se fixer à la matrice sans modifications,

- La récupération des cellules encapsulées dans une matrice ou un échafaudage (par exemple, pour l'isolement des acides nucléiques ou des protéines), le criblage et le biotraitement (thermique, par filtration) dans les systèmes de culture 3D comme les outils d'imagerie sont difficiles. L'autofluorescence des échafaudages (ou scaffolds) collagène est par exemple gênant pour les immunomarquages fins (Rimann et Graf-Hausner, 2012 ; Wu *et al.*, 2019).

La technologie de bioimpression 3D est l'une des innovations les plus intéressantes, mais l'idée de l'impression 3D n'est pas nouvelle. La première description de l'impression 3D a été faite par Charles W. Hull qu'il a appelé sa méthode « stérolithographie » (Hull, 2018). La formation de scaffolds 3D pour les matériaux biologiques a été la première étape du développement de cette technologie. L'étape suivante consistait à évaluer la technique qui permet d'imprimer des cellules vivantes

couche par couche dans des scaffolds 3D (Murphy et Atala, 2014).

Le succès du processus de bioimpression dépend de la sélection des cellules pour l'impression de tissus ou d'organes. L'impression d'organes ou de tissus nécessite plusieurs types de cellules, par exemple, les cellules fonctionnelles primaires, les cellules souches pluripotentes embryonnaires et induites. Les cellules choisies doivent être robustes pour survivre au processus d'impression, et donc, dans de nombreuses études, des lignées cellulaires sont utilisées. Par exemple, les fibroblastes ou les lignées cellulaires transformées sont suffisamment robustes pour résister aux contraintes de cisaillement et à la pression (Mironov *et al.*, 2002).

e. Limites éthiques

De nombreuses questions éthiques entourant la recherche sur les organoïdes et les gastruloïdes ont déjà été identifiées. Le problème d'éthique se pose sur les organoïdes cérébraux (cérébroïdes) et la notion de « conscience » des structures formées. La création de chimères par xénotransplantation pour assurer la vascularisation et l'innervation des organoïdes, par transplantation des cérébroïdes humains dans le cerveau d'animaux adultes n'est pas couverte par la réglementation (Lavazza et Massimini, 2018). Ces manipulations posent un réel problème éthique car expérimentalement il est possible de modifier l'activité cérébrale d'un animal transplanté avec une structure cérébrale humaine (Yeager, 2018). Ainsi une greffe de cellules gliales humaines peut modifier les fonctions cognitives d'une souris (McGinley *et al.*, 2018). Bon nombre de ces problèmes ne sont pas spécifiquement traités par les structures de contrôle de l'éthique existants, mais ces contrôles pourraient être facilement étendus pour garantir que la recherche sur les organoïdes et connexes progresse de manière appropriée et éthique (Munsie *et al.*, 2017). Les membres de la Société internationale de recherche sur les cellules souches (ISSCR) ont rédigé de nouvelles recommandations pour la recherche sur les cellules souches afin de tenir compte des progrès de la science sur les cellules souches et d'autres

domaines de recherche devant être protégés et cadrés sur les problèmes éthiques, sociaux et politiques qui ont surgi depuis la dernière mise à jour en 2016. Ces guidelines comprennent des orientations scientifiques et éthiques pour le transfert de cellules souches pluripotentes humaines et de leurs dérivés dans des modèles animaux (Lovell-Badge *et al.*, 2021).

Le comité d'éthique de l'INSERM s'est également penché sur les enjeux éthiques de la recherche sur les organoïdes qui pour l'instant ne possède pas de cadre légal (<https://www.hal.inserm.fr/inserm-02544395/document>).

Une autre question éthique se pose sur l'utilisation de sérum de veau foetal en culture cellulaire. Elle est très controversée de par la méthode de production de ces sérums et de nombreux substituts (plasma humain (Vlaski-Lafarge *et al.*, 2019), sérums de synthèse...) sont développés afin de ne plus utiliser le sérum animal.

f. La modélisation : les méthodes *in silico* et les apports des « omiques » (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique...)

Les méthodes *in silico* sont faites grâce aux développements des outils informatiques par simulation numérique.

L'étude des omiques, ou études à haut débit, sont en pleine expansion avec de nombreux domaines d'approches, des plus anciens comme la génomique, la transcriptomique, aux plus récents tels que la microbiomique, ou l'exposomique et permettent ainsi d'avoir de nombreuses données utilisables *in silico*. Les omiques associées à un traitement statistique puissant des données permettent d'obtenir un grand nombre d'informations à partir d'un seul échantillon (ce qui permet la réduction des échantillons, en lien avec les 3R).

Les apports de la omique, combinés à la bioinformatique résultante de la nécessité de traiter l'information génomique et d'une forte appropriation des technologies informatiques par des

chercheurs. Pour faciliter l'accès et le traitement des séquences biologiques, il y a eu nécessité de les enregistrer dans les banques, désormais en ligne sur internet. Ces banques de séquences sont filtrées par des équipes de bioinformaticiens pour réaliser des entrepôts de données dédiés à des recherches spécialisées sur un organisme, un type de molécule... (Gallezot, 2002). Ceci permet ainsi d'avoir accès à de nombreuses données pouvant être traitées pour différents thèmes de recherche sans reproduire les expérimentations.

En agronomie, par exemple, une étude a utilisé les approches *in silico* pour comprendre la croissance de *Staphylococcus aureus* sur les produits fabriqués à partir de viande porcine, et a ainsi démontré que la bactérie se développe plus vite dans le jambon que dans la saucisse, ceci étant lié à l'effet de la température (Tango *et al.*, 2015). Les méthodes *in silico* associées aux données omiques permettent des études mécanistiques ainsi que des études de mise en relation de gènes, de protéine pour l'étude d'une fonction.

g. La communauté scientifique

Un atout majeur à l'heure actuelle est que les sociétés scientifiques s'organisent : le Groupement de Recherche sur les Organoïdes (GDR, 2102) par exemple (<https://gdr-organoïdes.cnrs.fr/>) a été créé en 2021 par le CNRS et a pour responsable le Dr. Vincent Flacher et regroupe des scientifiques de nombreux instituts de recherche français. Il a pour but de soutenir ce champ de recherches, en permettant aux membres de la communauté scientifique et aux industriels d'échanger et de structurer le domaine en France. À INRAE le groupe Organoïdes piloté par Bertrand Pain permet aux membres de la même communauté scientifique d'échanger sur le développement des outils en médecine vétérinaire et en agronomie.

Le regroupement d'experts sur le potentiel extraordinaire de ces technologies en plein essor au service de la recherche fondamentale et appliquée dans les domaines des sciences de la vie, de la santé humaine et animale et du bien-être est primordial pour son avancée.

Conclusion

Selon la Directive 2010/63/UE3 : « S'il est souhaitable de remplacer l'utilisation d'animaux vivants [...] elle demeure nécessaire pour protéger la santé humaine et animale ainsi que l'environnement ». Ceci montre l'étendue des travaux qu'il reste à faire pour pouvoir encore diminuer le nombre d'animaux en expérimentation animale. Cependant à travers cette synthèse nous voyons les efforts faits

par la communauté scientifique pour développer de nouvelles alternatives et répondre aux attentes réglementaires mais aussi sociétales. Il est important de préciser que la recherche fondamentale s'appuie sur les modèles les plus pertinents alors qu'en recherche translationnelle (ex : agronomique), les chercheurs utilisent l'espèce concernée par leur application. Les travaux sur animaux de rente sont donc essentiels pour répondre aux questions liées à l'espèce concernée et de nombreux exemples montrent que la transposition des résultats

obtenus sur une espèce modèle reste compliquée sur les animaux d'espèce agronomique. Ainsi, en agronomie et en médecine vétérinaire les études physiologiques et génétiques utilisant les modèles *in vitro* 3D sont en développement pour l'étude de l'animal et présentent de nombreux avantages. D'autres méthodes sont également développées telles que les études *in silico*, la modélisation et l'intégration de gros jeux de données (big data) qui permettent de diminuer le nombre d'animaux en expérimentation animale.

Références

- Archer F., Bobet-Erny A., Gomes M., 2021. State of the art on lung organoids in mammals. *Vet. Res.*, 52, 77. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00946-6>
- Archibald A.L., Daetwyler H.D., Groenen M.A.M., Harrison P.W., Houston R.D., Kühn C., Lien S., Macqueen D.J., Reedy J.M., Robledo D., Watson M., Tuggle C.K., Giuffra E., 2020. From FAANG to fork : application of highly annotated genomes to improve farmed animal production. *Genome Biol.*, 21, 285. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02197-8>
- Baquerre C., Montillet G., Pain B., 2021. Liver organoids in domestic animals : an expected promise for metabolic studies. *Vet. Res.*, 52, 47. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00916-y>
- Beaumont M., Blanc F., Cherbuy C., Egidy G., Lisabetta E., Lacroix-Lamandé S., Wiedemann A., 2021. Intestinal organoids in farm animals. *Vet. Res.*, 52, 33. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00909-x>
- Bentham J., 1823. *An Introduction to the Principles of Morals and Legislation*, Oxford, Clarendon Press. <https://global.oup.com/academic/product/the-collected-works-of-jeremy-bentham-9780198205166?cc=fr&lang=en&>
- Bernard C., 1952. *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* [Texte imprimé] / Claude Bernard ; présentation de Constant Bourquin. Éditions Flammarion, Paris, France. 302 p.
- Boivin X., Bensoussan S., L'Hotellier N., Bignon L., Brives H., Brule A., Godet J., Grannec M.L., Hausberger M., Kling-Eveillard B.F., Tallet C., Courboulay V., 2012. Hommes et animaux d'élevage au travail : vers une approche pluridisciplinaire des pratiques relationnelles. In : Numéro spécial, Travail en élevage. Hostiou N., Dedieu B., Baumont R. (Eds). INRAE Prod. Anim., 25, 159-168. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2012.25.2.3205>
- Bourdon G., Cadoret V., Charpigny G., Couturier-Tarrade C., Dalbès-Tran R., Flores M.J., Froment L., Raliou M., Reynaud K., Saint-Dizier M., Jouneau A., 2021. Progress and challenges in developing organoids in farm animal species for the study of reproduction. *Vet. Res.*, 52, 42. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00891-w>
- Chansigaud V., 2020. *Histoire de la domestication animale*. Éditions : Delachaux & Niestlé-, 400p. <https://www.livres-medicaux.com/vie-animale/20864-histoire-de-la-domestication-animale.html>
- Chanvallon S., 2009. *Anthropologie des relations de l'Homme à la Nature : la Nature vécue entre peur destructrice et communion intime*. 1180p. https://books.google.fr/books/about/Anthropologie_des_relations_de_l_Homme.html?id=uC28ZwEACAAJ&redir_esc=y
- Chapouthier G., 2009. Le statut philosophique de l'animal : ni homme, ni objet. *Le Carnet PSY*, 139, 23-25. <https://www.cairn.info/revue-le-carnet-psy-2009-8-page-23.htm>
- Corvol P., 2012. <https://destinationsante.com/claude-bernard-le-pere-de-la-methode-experimentale.html>
- Descartes R., 1973. *Discours de la Méthode*. (Eds) Livre de Poche. <https://1000idcg.com/discours-de-la-methode/>
- Dessauge F., Schleder C., Perruchot M.H., Rouger K., 2021. 3D in vitro models of skeletal muscle : myosphere, myobundle and bioprinted muscle construct. *Res* 52, 72. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00942-w>
- Doi A., Park I.H., Wen B., Murakami P., Aryee M.J., Irizarry R., Herb B., Ladd-Acosta C., Rho J., Loewer S., Miller J., Schlaeger T., Daley G.Q., Feinberg A.P., 2009. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblast. *Nature Genet.*, 41, 1350-1353. <https://doi.org/10.1038/ng.471>
- Druzhkova A.S., Thalmann O., Trifonov V.A., Leonard J.A., Vorobieva N.V., Ovodov A.D., Graphodatsky A.S., Wayne R.K., 2013. Ancient DNA Analysis Affirms the Canid from Altai as a Primitive Dog. *PLoS ONE* 8, e57754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057754>
- Edmondson R., Jenkins Broglie J., Adcock A.F., Yang J., 2014. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *ASSAY and Drug Dev. Technol.*, 12, 207-218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>
- Eiraku M., Watanabe K., Matsuo-Takasaki M., Kawada M., Yonemura S., Matsumura M., Wataya T., Nishiyama A., Muguruma K., Sai Y., 2008. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 3, 519-532. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.09.002>
- Fiorelli C., Louret S., Porcher F., 2012. Les rationalités du travail avec les animaux d'élevage : produire, vivre ensemble et se construire. In : Numéro spécial, Travail en élevage. Hostiou N., Dedieu B., Baumont R., (Eds). INRAE Prod. Anim., 25, 181-192. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2012.25.2.3207>
- Gallezot G., 2002. La recherche in silico. In : Chartron G. (Ed). *Les chercheurs et la documentation numérique : nouveaux services et usages*, Édition du cercle de la Librairie, Collections. https://archivesic.ccsd.cnrs.fr/sic_00177318v1
- Gautier A., 1991. Domestication animale et animaux domestiques prétendument oubliés, Université de Liège, 1991, (ISSN 077724913 (<http://worldcat.org/issn/077724913&lang=fr>)). cité ici (<http://promethee.philo.ulg.ac.be/zoologica/lbodson/bibl/Resumes03.html>).
- Gey G.C., Coffman W.D., Kubicek M.T., 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, 12, 264-265.
- Guichet J., 2002. L'homme et la nature chez Rousseau : L'homme de la nature, un homme absolument isolé ou détenteur déjà d'une certaine culture ? *Revue des sciences philosophiques et théologiques*, 86, 69-84. <https://doi.org/10.3917/rspt.861.0069>
- Harrison R.G., 1907. Observations on the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record*. 1, 116-128. <https://doi.org/10.1002/ar.1090010503>
- Hooke R., 1665. *Micrographia* or, some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses with observations and inquiries thereupon. London : Printed by Jo. Martyn and Ja. Allestry ; 323 p. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.904>
- Hull C.W., 2018. Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. US 4575330. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US-6027324-A>

- Kant E., 1986. Œuvres philosophiques. Éditions Gallimard, Paris, France, Collection Bibliothèque de la Pléiade, 317, 1632p) Tome III. <https://www.la-pleiade.fr/Catalogue/GALLIMARD/Bibliotheque-de-la-Pléiade/OEuvres-philosophiques2>
- Kar S.K., Wells J.M., Ellen E.D., te Pas M.F.W., Madsen O., Groenen M.A.M., Woelders H., 2021. Organoids : a promising new in vitro platform in livestock and veterinary research. *Vet Res* 52, 43. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00904-2>
- Kim W., Lee H., Lee J, Atala A., Yoo J.J., Lee S.J., Kim G.H., 2020. Efficient myotube formation in 3D bio-printed tissue construct by biochemical and topographical cues. *Biomaterials*. 2020 Feb ; 230 : 119632. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119632>
- Lavazza A., Massimini M., 2018. Cerebral organoids : ethical issues and consciousness assessment. *J. Med. Ethics.*, 44, 606-610. <https://doi/10.1136/medethics-2017-104555>
- Le Neindre P, Guatteo R., Guemene D., Guichet J.L., Latouche K., 2009. Douleurs animales. Les identifier, les comprendre, les limiter chez les animaux d'élevage. 338p. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02990906> <https://www.inrae.fr/sites/default/files/pdf/eca1cfd56e7ebab5c9f7089673179aa4.pdf>
- Le Neindre P., Bernard E., Boissy A., Boivin X., Calandreau L., Delon N., Deputte B., Desmoulin-Canselier S., Dunier M., Faivre N., Giurfa M., Guichet J.L., Lansade L., Larrère R., Mormède P., Prunet P., Schaal B., Servièrè J., Terlouw C., 2017. Animal consciousness. EFSA supporting publication. 14 : EN-1196. 165pp. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1196>
- Lovell-Badge R., Anthony E., Barker R.A., Bubela T., Brivanlou A.H., Carpenter M., Charo R.A., Clark A., Clayton E., Cong Y., Daley G.Q., Fu J., Fujita M., Greenfield A., Goldman S.A., Hill L., Hyun I., Isasi R., Kahn J., Kato K., Kim J.S., Kimmelman J., Knoblich J.A., Mathews D., Montserrat N., Mosher J., Munsie M., Nakaguchi H., Naldini L., Naughton G., Niakan K., Ogbogu U., Pedersen R., Rivron N., Rooke H., Rossant J., Round J., Saitou M., Sipp D., Steffann J., Sugarman J., Surani A., Takahashi J., Tang F., Turner L., Zettler P.J., Zhai X., 2021. ISSCR Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation : The 2021 update. *Stem Cell Reports*. 16, 1398-1408. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.05.012>
- Lucey B.P., Nelson-Rees W.A., Hutchins G.M., 2009. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Archives Pathol. Laborat. Medi.*, 133, 1463-1467. <https://doi.org/10.1043/1543-2165-133.9.1463>
- Mandrycky C., Wang Z., Kim K., Kim D.H., 2016. 3D bio-printing for engineering complex tissues. *Biotechnol Adv.* 34, 422-434. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>
- Marano F., Hubert P., Geoffroy L., Juin H., 2020. Quelles alternatives en expérimentation animale ? Pratiques et éthique. Collection Savoir-faire. Éditions Quæ, Versailles, France, 186p. ISBN 978-2-7592-3187-4, référence 02740
- Marquis C.P., 2012. Mammalian cell culture. <https://www.eolss.net/sample-chapters/C17/E6-58-01-04.pdf>
- McGinley L.M., Kashlan O.N., Bruno E.S., Chen K.S., Hayes J.M., Kashlan S.R., Raykin J., Johe K., Murphy G.G., Feldman E.L., 2018. Human neural stem cell transplantation improves cognition in a murine model of Alzheimer's disease. *Sci Rep.*, 8, 14776. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33017-6>
- Meehan P.J., Wilson C., 2006. Use of ultraviolet lights in biological safety cabinets : a contrarian view. *Appl. Biosafety.* 11, 222-227. <https://doi.org/10.1177/153567600601100412>
- Mironov V., Boland T., Trusk T., Forgacs Markwald R.R., 2002. Organ printing : computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends in Biotechnology.* 21, 157-161. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00033-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00033-7)
- Miziara I.D., Magalhães A.T.M., Santos M.A., Gomes E.F., Oliveira R.A., 2012. Research ethics in animal models. *Braz. J. Otorhinolaryngol.*, 78, 128-131. <https://doi.org/10.1590/S1808-86942012000200020>
- De Montaigne M., 1962. Œuvres complètes. Éditions Gallimard, collection, Bibliothèque de la pléiade Paris, France. <https://www.gallimardmontreal.com/catalogue/livre/oeuvres-completes-montaigne-michel-de-9782070103638>
- Munsie M., Hyun I., Sugarman J., 2017. Ethical issues in human organoid and gastruloid research. *Dev.*, 144, 942-945. <https://doi.org/10.1242/dev.140111>
- Murphy S.V., Atala A., 2014. 3D bioprinting of tissue and organs. *Nature Biotechnol.*, 32, 773-785. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>
- Nashimoto Y., Hayashi T., Kunita I., Nakamasu A., Torisawa Y., Nakayama M., 2017. Integrating perfusable vascular networks with a three-dimensional tissue in a microfluidic device. *Integr. Biol.*, 9, 506-518. <https://doi.org/10.1039/c7ib00024c>
- Nicholas J.S., 1961. Ross Granville Harrison 1870-1959. *Biograph. Memoirs National Academy. Sci.*, 35, 132-162.
- O'Reilly R.J., 2003. Robert Alan Good, MD, PhD. *Biol Blood Marrow Transplant.* 9, 608-609. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2003.08.010>
- Orr B., Sutton K., Christian S. Nash T., Niemann H., Hansen L.L., McGrew M. J., Jensen S.R., Vervelde L., 2021. Novel chicken two-dimensional intestinal model comprising all key epithelial cell types and a mesenchymal sub-layer. *Vet. Res.*, 52, 142. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-01010-z>
- Pain B., 2021. Organoids in domestic animals : with which stem cells? *Vet. Res.*, 52, 38. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00911-3>
- Pain B., Baquerre C., Couplier M., 2021. Cerebral organoids and their potential for studies of brain diseases in domestic animals. *Vet. Res.*, 52, 65. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00931-z>
- Petroianu A., 1996. Aspectos éticos na pesquisa em animais. *Acta Cir. Bras.*, 11, 157-64. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-182632>
- Plutarque, 2002. Manger la chair ? Traité sur les animaux. Éditions Rivages poche/Petite Bibliothèque Paris, France, 112p. <https://www.payot-rivages.fr/rivages/livre/manger-la-chair-9782743643164>
- Porphyre, 1979. De l'abstinence. Texte traduit par Bouffartigue J., Patillon M., (Ed.) Belles Lettres. Éditions Belles Lettres, Paris, France, Livre III. <https://rspa.ups2259.vjf.cnrs.fr/01/reference-bibliographique/par-id/f7cd76bbf95a5f77117063c83eea47dc8e841bec>
- Rimann M., Graf-Hausner U., 2012. Synthetic 3D multicellular systems for drug development. *Current Opinion Biotechnol.*, 23, 803-809. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.01.011>
- Rodriguez-Hernandez C.O., Torres-Garcia S.E., Olvera-Sandoval C., Ramirez-Castillo F.Y., Muro A.L., Avelar-Gonzalez F.J., Guerrero-Barrera A.L., 2014. Cell culture : history, development and prospects. *Int. J. Current Res. Academic Review.* 12, 188-200.
- Rossi G., Manfrin A., Lutolf M.P., 2018. Progress and potential in organoid research. *Nat. Rev. Genet.*, 19, 671-687. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0051-9>
- Sanchez A., Plouzeau M., Rault P., Picard M., 2000. Croissance musculaire et fonction cardio-respiratoire chez le poulet de chair. (Eds). *INRA Prod. Anim.*, 13, 37-45. <https://doi.org/10.20870/productions-animales>
- Sander K., 1991. Wilhelm Roux and the rest : Developmental theories 1885-1895. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 200, 297-299. <https://doi.org/10.1007/BF00665523>
- Sato T., Vries R.G. Snippert H.J., van de Wetering M., Barker N., Stange D.E., van Es. J.H., Abo A., Kujala P., Peters P.J., Clevers H., 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459, 262-265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- Singer P., 2012. La libération animale. Payot, Éditions, Collection Petite Bibliothèque Payot, 480p. <https://www.payot-rivages.fr/payot/livre/la-lib%C3%A9ration-animale-9782228908146>
- Smyth D.H., 1978. Alternatives to Animal Experiments—A scolar paperback. Scolar Press [for] the Research Defence Society, ISBN : 0859673952, 9780859673952. 218p
- Souci L., Denesvre C., 2021. 3D skin models in domestic animals. *Vet. Res.*, 52, 21. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00888-5>
- Soupault R., 1952. Vie d'Alexis Carrel 1873-1944, Ouvrage écrit par un chirurgien ayant fait partie du Groupe collaboration, Plon (Eds).
- Souza A.G., Ferreira I.C.C., Marangoni K., Bastos V.A.F., Goulart V.A., 2016. Advances in cell culture : more than a century after cultivating cells. *J. Biotechnol. Biomaterials.* 6, 1-4. <https://doi.org/10.4172/2155-952X.1000221>
- Storb R., 2012. Edward Donnan Thomas (1920-2012). *Nature*. 491, 334. <https://doi.org/10.1038/491334a>

Sykova E., Forostyak S., 2013. Stem cells in regenerative medicine. *Laser Therapy*, 2, 87-92. <https://doi.org/10.5978/islsm.13-RE-01>

Takahashi K., Yamanaka S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

Tango C.N., Park J.H., Oh D.H., 2015. An experimental validated *in silico* model to assess *Staphylococcus aureus* growth kinetics on different pork products. *J. Appl. Microbiol.*, 120, 684-696. <https://doi.org/10.1111/jam.13028>

Tannenbaum J., Bennett B.T., 2015. Russell and Burch's 3Rs then and now : the need for clarity in definition and purpose. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 54, 120-132.

Trounson A., DeWitt N.D., 2013. Pluripotent stem cells from cloned human embryos : success at long last. *Cell Stem Cell*, 12, 636-638. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.05.022>

Vermeire B., Gonzalez L.M., Jansens R.J.J., Cox E., Devriendt B., 2021. Porcine small intestinal organoids as a model to explore ETEC-host interactions in the gut. *Ve.t Res.*, 52, 94. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00961-7>

Vlaski-Lafarge M., Chevalyre J., Cohen J., Lafarge X., Ivanovic Z., 2019. Le plasma de sang placentaire, une alternative au sérum de veau foetal *Transfusion Clinique et Biologique* 26, S104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tracbi.2019.06.228>

Wu Y.C., Wang Y.C., Wang W.T., Wang H.D., Lin H.H., Su L.J., Kuo Y.R., Lai C.S., Ho M.L., Yu J., 2019.

Fluorescent Nanodiamonds Enable Long-Term Detection of Human Adipose-Derived Stem/Stromal Cells in an *In Vivo* Chondrogenesis Model Using Decellularized Extracellular Matrices and Fibrin Glue Polymer. *Polymers*, 11. <https://doi.org/10.3390/polym11091391>

Xiang Y., Miller K., Guan J., Kiratitanaporn W., Tang M., Chen S., 2022. 3D bioprinting of complex tissues *in vitro* : state-of-the-art and future perspectives. *Arch. Toxicol.*, 96, 691-710. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03212-y>

Yeager A., 2018. As Brain Organoids Mature, Ethical Questions Arise. *The Scientist*, 1er août 2018. <https://www.the-scientist.com/features/brain-organoids-mature--raise-ethical-questions-64533>

Résumé

En France, l'utilisation des animaux à des fins scientifiques fait l'objet d'une réglementation stricte depuis plus de 25 ans. Son évolution s'effectue principalement dans un cadre européen. La directive 86/609 visait ainsi à l'harmonisation des pratiques entre les Etats membres. En France, comme en Europe, les textes réglementaires sur la protection animale et l'utilisation de l'animal en expérimentation sont de plus en plus exigeants. La directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques a fortement renforcé les exigences vis-à-vis de l'utilisation des animaux. Cette nouvelle directive s'attache plus particulièrement aux mesures concernant l'évolution du nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques et éducatives, cette utilisation « demeurant nécessaire pour protéger la santé humaine, la santé animale et l'environnement ». Le corpus réglementaire fait de la diminution du nombre d'animaux en expérimentation un défi majeur de la société scientifique. Des méthodes modernes telles que les méthodes *in vitro*, *in silico* et de modélisation permettent actuellement de diminuer le nombre d'animaux en expérimentation animale et d'être complémentaires à ces expérimentations. Ces méthodes sont en plein essor et il reste encore de nombreuses découvertes à faire afin de pouvoir répondre à plus de questions scientifiques par des méthodes alternatives.

Abstract

Approaches complementary to animal experimentation in agronomy and veterinary clinics: solutions and limits

*In France, the use of animals for scientific purposes has been regulated for more than 25 years. Its evolution takes place mainly within a European framework. Directive 86/609 thus aimed to harmonize practices between the Member States. In France as in Europe, regulatory texts on animal protection and the use of animals in experimentation are increasingly demanding. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 relating to the protection of animals used for scientific purposes has greatly reinforced the requirements vis-à-vis animal use. The new directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the 22nd of September 2010 focuses more particularly on measures for reducing animals used for scientific purposes, this use «remaining necessary to protect human health, animal health and the environment ». The regulatory corpus associated with the regulations on ethics and animal welfare makes the reduction in the number of animals in experimentation a major challenge for the scientific society. Modern cell culture methods, *in silico* and modelling methods currently make it possible to reduce the number of animals in animal experiments and to be complementary to these experiments. These methods are booming and there is still a lot of progress to be made in order to be able to answer more scientific questions by alternative methods.*

PERRUCHOT M.-H., DESSAUGE F., 2023. Les approches complémentaires à l'expérimentation animale en agronomie et clinique vétérinaire : Solutions et limites. In : *Cellules souches et Organoides : réalités et perspectives*. Taragnat C., Pain B. (Eds). Dossier, INRAE Prod. Anim., 36, 7599.

<https://doi.org/10.20870/productions-animales.2023.36.2.7599>



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY 4.0).

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.fr>

La citation comme l'utilisation de tout ou partie du contenu de cet article doit obligatoirement mentionner les auteurs, l'année de publication, le titre, le nom de la revue, le volume, les pages et le DOI en respectant les informations figurant ci-dessus.

