

Sommaire

Éditorial	p. 2
Histoire des Neurosciences	p. 3
• Théorie de la transmission nerveuse à la plaque motrice d'Alfred Vulpian	
La revue Neuropsychologie	p. 5
Tribune libre	p. 6
• Une nouvelle ère pour la recherche sur la maladie d'Alzheimer : les microARNs	
Dossier	p. 9
• L'expérimentation animale au troisième millénaire	
Lecture Alfred Fessard	p. 18
• Christine Petit	
Colloque biennal	p. 19
• Colloque de la Société 2009 : un grand millésime !	
Assemblée Générale	p. 20
Prix de la Société	p. 26
Semaine du Cerveau	p. 27

L'expérimentation animale au troisième millénaire

par Stéphane Gaillard et David Blum

Un rapport de la Commission Européenne datant de 2007 précise que plus de 12 millions d'animaux sont utilisés par an à des fins expérimentales et scientifiques dans l'ensemble des États membres de l'Union Européenne (1). Aujourd'hui, de nombreux groupements d'intérêt militent en faveur de la réduction voire la suppression de l'expérimentation animale, donnant à la question le statut de véritable débat de société, débat malheureusement trop souvent houleux. Conscientes de cette situation, les instances dirigeantes tant françaises qu'européennes ont, tout récemment, réactualisé les différents textes qui encadrent l'expérimentation animale et des structures chargées d'étudier de manière approfondie le sujet ont été mises en place, à l'exemple du groupe de travail "Animal et Société" instauré en 2008 par Michel Barnier, alors ministre de l'agriculture et de la pêche. La Communauté Européenne, quant à elle, vient, en 2009, de proposer une révision de sa législation en matière d'expérimentation animale, vieille de près d'un quart de siècle. Face à ces récentes évolutions et à l'importance de la pratique expérimentale chez l'animal dans le domaine des neurosciences, la Lettre propose de faire le point dans ce dossier.

Les réglementations

L'utilisation d'animaux dans le but d'acquérir et d'augmenter les connaissances biologiques et médicales remonte à l'antiquité. Le droit romain interdisant la dissection de cadavres humains, on peut attribuer à Galien (environ 130-200 après JC) la pratique systématique de l'expérimentation animale, principalement sur des cochons et des singes. En dépit de l'ancienneté de cette pratique, aucune réglementation, tant législative que morale ne sera mise en place avant le XX^e siècle. En France, malgré la florissante école de physiologie du XIX^e siècle - et si l'on fait abstraction de la Loi Grammont, votée en 1850, essentiellement axée sur la protection des animaux domestiques - il faut attendre 1968 pour voir apparaître la notion légale d'autorisation pour l'expérimentation ou les recherches scientifiques pratiquées sur des animaux vivants (décret n° 68-139 du 9 février 1968) et 1976 pour que soit votée la première loi accordant à l'animal son statut d'être sensible. Cette loi (n° 76-629 du 10 juillet 1976) ordonne en effet, dans son article 12 (au milieu de considérations sur la divagation des chiens et des chats, dont les maires peuvent ordonner qu'ils soient tenus en laisse), que "l'article 276 du code rural soit remplacé par les dispositions suivantes :

- Il est interdit d'exercer des mauvais traitements envers les animaux domestiques ainsi qu'envers les animaux sauvages apprivoisés ou tenus en captivité.
- Des décrets en Conseil d'État déterminent les mesures propres à assurer la protection de ces animaux contre les mauvais traitements ou les utilisations abusives et à leur éviter des souffrances lors des manipulations inhérentes aux diverses techniques d'élevage, de parage, de transport et d'abattage des animaux".

Conscients (!) de l'importance des problèmes liés à l'expérimentation animale, les législateurs de 1976 lui consacrent néanmoins UNE phrase, ajoutant laconiquement :

"Il en est de même pour ce qui concerne les expériences biologiques médicales et scientifiques qui doivent être limitées aux cas de stricte nécessité". Ce troisième alinéa de l'article 276 du code rural constituera, pendant plus de dix ans, la seule référence législative française en matière d'expérimentation animale et ne sera définitivement abrogé que le 15 juin 2000, par l'ordonnance n° 2000-550.

C'est à l'échelon européen qu'apparaissent en 1985 les premiers textes encadrant l'utilisation des animaux à des fins expérimentales. Ces travaux aboutiront à la Convention STE 123, signée à Strasbourg par les 21 états membres du conseil de l'Europe le 18 mars 1986. Ce texte sera repris et consolidé sous la forme de la directive 86/609/CEE du Conseil des Communautés Européennes du 24 novembre 1986 "relative à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques". Cette directive 86/609 donne la ligne de conduite à suivre par les états membres pour sa traduction en droit national ; elle est toujours d'actualité en 2009.

À l'inverse de la loi française de 1976, la directive européenne 86/609 se veut très détaillée (on y apprend même dans son annexe II, relative à l'hébergement et aux soins des animaux que dans les cages destinées à recevoir des oiseaux "les abreuvoirs devraient avoir la même longueur que les mangeoires"). Les principaux volets de cette directive définissent ou précisent : les espèces animales concernées et les finalités de leur utilisation ; les conditions de soins et d'hébergement des animaux ; les conditions de contrôle de la bonne exécution de la directive ; les compétences et autorisations requises pour la pratique des expérimentations ; la nécessité d'une réflexion en vue de la mise en place de méthodes alternatives à l'expérimentation ; les types d'anesthésie ; la nécessité d'une notification préalable précisant les expériences et leurs protocoles ; la formation des personnels ; les condi-

tions de fonctionnement des établissements d'élevage fournisseurs d'animaux destinés à l'expérimentation et des établissements utilisateurs de ces animaux ; les caractéristiques des locaux destinés aux expérimentations. La directive 86/609 précise également qu'elle "ne limite pas le droit des États membres d'appliquer ou d'adopter des mesures plus strictes pour assurer la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou pour contrôler et restreindre l'utilisation d'animaux dans des expériences".

Initialement limitée aux expériences réalisées sur des animaux vertébrés à des fins de mise au point et de production de médicaments, de prévention, de diagnostic ou de traitement de maladies et d'évaluation de caractéristiques physiologiques, la directive européenne de 1986 a été rapidement élargie à tous les types d'animaux utilisés en expérimentation, y compris ceux utilisés en recherche fondamentale ou à des fins d'enseignement. Le texte de la directive 86/609 est consultable à l'adresse suivante :

http://ec.europa.eu/food/fs/aw/aw_legislation/scientific/86-609-eec_fr.pdf

La directive 86/609 a été traduite en droit français par le décret n° 87-848 du 19 octobre 1987 relatif aux expériences pratiquées sur les animaux et par trois arrêtés du 19 avril 1988 fixant les conditions de fourniture d'animaux aux laboratoires agréés ; les conditions d'attribution de l'autorisation de pratiquer des expériences sur les animaux et les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements d'expérimentation animale. Ces textes, toujours en vigueur en 2009, seront complétés par les décrets 2001-464 du 29 mai 2001 et 2003-768 du 1^{er} août 2003 qui précisent encore les types d'expériences et d'animaux autorisés, l'origine des animaux, les conditions d'obtention de l'autorisation d'expérimenter, les conditions nécessaires à l'agrément des établissements ainsi que les modalités de leur contrôle. Ces arrêtés précisent par ailleurs les divers niveaux de responsabilité des personnels ainsi que les peines encourues en cas de manquement aux différentes dispositions.

Un quart de siècle déjà...

Bien qu'étant fort détaillée, la directive européenne 86/609, à la base de notre législation nationale date de près d'un quart de siècle. Les techniques, les thématiques et surtout les mentalités ont profondément évolué depuis sa rédaction et de nombreuses initiatives ont vu le jour au cours des dernières années pour actualiser, réviser, voire totalement réformer cette directive. L'une de ces initiatives émane de l'European Coalition for Biomedical Research (ECBR). Fondée en novembre 2006, l'ECBR

regroupe une cinquantaine d'associations académiques, sociétés savantes et instituts de recherches biomédicales européens autour d'un projet de révision de la directive 86/609. À travers ces différentes associations, l'ECBR compte environ 50 000 scientifiques, parmi lesquels tous les membres de notre *Société des Neurosciences*⁽¹⁾.

Face à ces diverses initiatives, la Commission des Communautés Européennes a présenté, en novembre 2008, une proposition de révision de la directive 86/609. Cette proposition vise à renforcer, conformément au protocole de l'Union Européenne sur le bien-être des animaux, la protection des animaux encore utilisés dans le cadre de procédures scientifiques, à assurer à l'industrie des conditions de concurrence équitables dans toute l'Union Européenne et à améliorer la qualité des activités de recherche qui y sont menées. Les nouvelles dispositions doivent contribuer également à limiter, autant qu'il est possible, le nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales.

En bref, la proposition comporte des dispositions concernant :

- l'acquisition, l'élevage, le marquage et la détention d'animaux, y compris des obligations en matière d'hébergement et de soins ;
- l'autorisation et le fonctionnement des établissements d'élevage qui fournissent ou utilisent des animaux et les inspections de ces établissements ;
- l'autorisation des personnes qui utilisent des animaux ou s'en occupent, qui supervisent ou sont chargées de concevoir des projets utilisant des animaux ;
- l'évaluation et l'autorisation de projets utilisant des animaux, y compris leur appréciation rétrospective ;
- le choix des procédures et leur exécution ;
- la mise au point, la validation, l'acceptation réglementaire et l'adoption d'approches alternatives ;
- la transparence assurée par la publication d'informations non techniques sur les projets, par des règles d'application nationales et des lignes directrices, ainsi que par des rapports sur la mise en œuvre et des statistiques.

À cet effet, la nouvelle proposition fixe des règles relatives aux aspects suivants :

1. le remplacement et la réduction de l'utilisation d'animaux dans les procédures scientifiques et le perfectionnement des conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et d'utilisation des animaux dans ces procédures ;
2. l'origine, l'élevage, le marquage, les soins et l'hébergement des animaux ;
3. le fonctionnement des établissements d'élevage et des établissements fournisseurs ou utilisateurs ;
4. l'évaluation et l'autorisation de projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures.

⁽¹⁾ La Société des Neurosciences est membre de la FENS qui est affiliée à l'European Brain Council, un des membres de l'ECBR.

Le texte de cette proposition a été débattu et amendé par diverses commissions (environnement, agriculture) au sein du parlement européen entre mars et avril 2009 pour être finalement voté et adopté le 5 mai 2009. Le texte intégral peut être consulté à l'adresse suivante : www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?type=TA&reference=P6-TA-2009-0343&language=EN&ring=A6-2009-0240

Pour que cette proposition devienne loi, elle doit encore faire l'objet d'une seconde lecture au Parlement Européen et être approuvée par le Conseil.

Et l'éthique dans tout ça ?

Quel que soit son encadrement législatif, l'expérimentation animale repose sur le principe selon lequel l'homme s'autorise à la pratiquer. Ce principe n'a commencé à être remis en cause qu'à partir du milieu du XIX^e siècle. C'est le physiologiste anglais Marshall Hall (connu pour ses travaux sur l'arc réflexe) qui en 1831 a, le premier, établi des recommandations destinées à améliorer le bien-être des animaux utilisés à des fins expérimentales (2). Selon lui, l'expérimentation animale doit obéir aux cinq principes fondamentaux suivants :

1. On ne doit jamais avoir recours à l'expérimentation si la simple observation peut nous permettre d'obtenir l'information désirée.
2. Aucune expérimentation ne doit être réalisée sans avoir défini un objectif précis et sans la certitude que cet objectif sera atteint par cette expérimentation.
3. On ne doit pas, sans nécessité, répéter des expériences qui ont été déjà réalisées par d'autres physiologistes.
4. Toute expérience justifiée doit être réalisée avec le minimum de souffrance pour l'animal.
5. Toute expérience de physiologie doit être réalisée de façon à donner les résultats les plus précis et les plus documentés afin d'éviter autant que possible la nécessité de la répéter.

Dans l'introduction de son ouvrage de 1831, Hall précise : "In order fully to accomplish these objects, it will be desirable to form a society for physiological research. Each member should engage to assist the others. It should be competent to any member to propose a series of experiments, its mode, its objects. These should be first fully discussed, - purged from all sources of complication, prejudice, or error, - or rejected. If it be determined that such series of experiments be neither unnecessary nor useless, [...], they should then be performed, repeated if necessary, and duly attested. Lastly, such experiments, with the deductions which may flow from them, may then be published with the inestimable advantage of authenticity". Dans ce paragraphe, Marshall Hall pose précisé-

ment les principes de création et de fonctionnement des comités d'éthique qui ne seront mis en place que plus de 150 ans plus tard. Ces principes fondamentaux ne reçurent, en effet, en leur temps que peu d'écho, le bien-être de l'animal de laboratoire n'était pas la préoccupation principale du XIX^e siècle, époque où, dans nos campagnes, les animaux domestiques étaient encore menés à l'aiguillon⁽²⁾. Il faut attendre 1959, avec la publication de l'ouvrage de William Russel et Rex Burch (3), pour que les principes énoncés par Marshall Hall soient repris et développés par l'introduction de la règle des "3R" : "Replacement, Reduction, Refinement" (voir encadré) devant être appliquée à toute expérimentation animale et qui constitue encore aujourd'hui l'un des fondements de toute démarche éthique en matière d'expérimentation animale en Europe.

Les structures d'encadrement en France

Quelle que soit sa qualité, la législation ne peut encadrer totalement la pratique quotidienne à la paillasse et d'autre part la recherche, d'une façon générale, nous amène nécessairement à travailler dans des domaines et avec des techniques sur lesquels la législation n'a pas encore statué. C'est pourquoi, certains comités se sont spontanément créés dans les années 1970 afin d'établir des règles de base permettant de concilier recherche expérimentale et éthique morale. La première charte fran-

La règle des 3R

- **Replacement** : Remplacer l'expérimentation animale chaque fois que possible par une méthode alternative : développement des cultures cellulaires et de modèles mathématiques par exemple. Remplacer les expériences sur des animaux "sensibles" (primates, chien, chat) par des expériences sur des animaux "moins sensibles".
- **Reduction** : Réduire le nombre des animaux utilisés. Étude statistique préalable pour une bonne estimation du nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Harmonisation des procédures européennes permettant ainsi la reconnaissance réciproque des résultats.
- **Refinement** : Raffiner les méthodes expérimentales de façon à réduire la souffrance et le stress de l'animal tout en obtenant des résultats de meilleure qualité qui n'auront pas à être répétés. Développer et améliorer les méthodes d'analgésie et d'anesthésie. Développer de nouvelles méthodes moins invasives (les techniques modernes d'exploration fonctionnelle in vivo comme le PETscan ou l'échographie ainsi que l'utilisation des mesures téléométriques répondent parfaitement à ce critère).

(2) L'usage de l'aiguillon ne sera définitivement interdit en France qu'en octobre 1980 (Décret n° 80-791).

çaise de l'éthique de l'expérimentation animale a été établie au Centre Européen de la Tufts University à Talloires sous les auspices de la fondation Marcel Mérieux en août 1979, à la suite du Symposium International sur "l'animal de laboratoire au service de l'homme" qui a eu lieu à Lyon en septembre 1978 à l'occasion du centenaire de la mort de Claude Bernard. Cette charte rappelait la nécessité de l'expérimentation animale et précisait les devoirs de l'homme en matière de respect de l'animal, de sa sensibilité et de sa souffrance. La Charte de Talloires est consultable sur le site de l'École Vétérinaire de Lyon à l'adresse suivante : www2.vet-lyon.fr/ens/expa/docs/ethique_Cl.Bernard.html

Depuis la fin des années 70, les comités d'éthique se sont peu à peu structurés dans la majeure partie des pays européens. En France, ces comités existent principalement sous deux formes : les comités internes et les comités régionaux. Les comités internes sont mis en place par un établissement de recherche (privée ou public) dans le but de contrôler les expérimentations qui y sont réalisées. Ils sont constitués de scientifiques et de non scientifiques, appartenant ou non à l'établissement. Le fonctionnement de ces comités est conforme à la charte du Groupe de Réflexion Interprofessionnel sur les Comités d'Éthique (GRICE), l'une des commissions du Groupe Interprofessionnel de Réflexion et de Communication sur la Recherche (GIRCOR) qui est une association régie par la loi de 1901 et dont les membres sont des entreprises privées et des établissements publics français de recherche biologique. Les comités régionaux ont, quant à eux, été mis en place à partir de 2001 par la recherche publique pour répondre aux besoins des grandes structures de recherche. Ces comités régionaux sont interorganismes et ont un rôle consultatif mais non réglementaire à l'heure actuelle ; cependant leur approbation est de plus en plus fréquemment exigée pour les publications ou pour l'obtention de financements européens ; ils sont aujourd'hui au nombre de vingt. *(Pour plus de détails, lire plus bas le témoignage de Raymond Nowak sur le fonctionnement au quotidien des comités d'éthique).*

Au cours des dernières années, plusieurs structures ont été mises en place afin d'harmoniser le fonctionnement de ces différents comités. La Commission Nationale de l'Expérimentation Animale (CNEA) a été instituée en 2003 (décret 2003-768) auprès des ministres chargés de la recherche et de l'agriculture, en application des articles R. 214-116 et suivants du Code Rural. Elle regroupe des représentants de l'État, des représentants des milieux professionnels publics et privés et des représentants des associations de protection animale. Cette commission donne son avis sur tout projet de modification de la législation ou de la réglementation relative à l'expérimentation animale. Elle peut également être consultée par les

ministres auprès desquels elle est placée, donner des avis et faire toute proposition qu'elle juge utile sur :

1. La mise en place de méthodes expérimentales permettant d'éviter l'utilisation d'animaux vivants ;
2. L'élevage d'animaux de laboratoire lorsque l'utilisation de ceux-ci est indispensable ;
3. Les méthodes de nature à améliorer les conditions de transport, d'hébergement et d'utilisation des animaux de laboratoire ;
4. La formation des personnes appelées à utiliser des animaux à des fins scientifiques et expérimentales et celle des techniciens de laboratoire.

Sur proposition de la CNEA, un Comité National de Réflexion Éthique sur l'Expérimentation Animale (CNREEA) a été créé en 2005 par les ministres chargés de la recherche et de l'agriculture. Ce comité national tire sa légitimité à la fois du décret fondateur et de sa composition : il est en effet constitué de représentants de la société civile (philosophes, sociologues, juristes), d'associations de protection animale, de représentants des professionnels de l'expérimentation animale, privés et publics, et de l'État. Il a pour mission d'émettre des avis sur les questions éthiques soulevées par l'expérimentation animale et d'harmoniser les principes et le fonctionnement des différents comités d'éthique locaux et régionaux. L'une de ses premières actions a été d'élaborer la charte nationale de l'expérimentation animale. Cette charte illustre l'engagement des chercheurs et des organismes de recherche à l'égard du respect de l'animal, elle est destinée à encadrer en France la démarche éthique des expérimentateurs et à harmoniser le travail des comités d'éthique, qui nous l'avons vu, se sont constitués en dehors de toute disposition légale. Cette absence de contrainte caractérise l'éthique qui doit demeurer indépendante d'obligations réglementaires, parce qu'elle fait appel à la conscience des individus. Outil de référence pour les expérimentateurs, les institutions et les comités d'éthique, la charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale énonce les principes qui doivent s'appliquer à cette démarche. L'article 7 de la charte nationale met en place et définit le rôle des comités d'éthique en expérimentation animale qui sont des instances consultatives dont la mission est de promouvoir l'ensemble des principes et pratiques éthiques en expérimentation animale. Tout établissement d'expérimentation animale doit relever d'un, et d'un seul, comité d'éthique. Plusieurs établissements peuvent dépendre du même comité en s'associant pour créer ce comité qui leur est commun. La charte nationale peut être consultée à l'adresse suivante : http://media.enseignementsup-recherche.gouv.fr/file/Science_et_societe/11/8/chartexpeanimale_20-01-09_62118.pdf

La formation des personnels

Les différents textes législatifs ainsi que les chartes émanant des divers comités d'éthique insistent particulièrement sur la nécessité d'une formation adéquate des personnels autorisés à expérimenter sur les animaux ou chargés de leur hébergement et de leurs soins.

Trois niveaux de formation existent en France, ils sont approuvés par le Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche et des affaires rurales après avis de la commission nationale de l'expérimentation animale.

Le niveau I (ou niveau C dans les autres états de l'Union européenne) est assorti à une obligation de formation initiale ou d'expérience professionnelle, cette formation est obligatoire pour obtenir une autorisation nominative d'expérimenter sur animaux vivants.

Le niveau II (niveau B) est la formation exigible pour les personnes appelées à participer directement aux expériences mais non titulaires de l'autorisation d'expérimenter. Indépendante du niveau de formation initiale, cette formation ne leur permet ni de solliciter une autorisation nominative d'expérimenter sur animaux vivants ni d'assurer la responsabilité scientifique d'une expérimentation.

Le niveau III (niveau A) est la formation obligatoire pour les personnes affectées à l'hébergement, à l'entretien et aux soins des animaux. Cette formation ne les autorise cependant pas à participer directement aux expérimentations.

La pratique d'actes chirurgicaux sur des animaux vivants n'est autorisée que sous la responsabilité d'une personne titulaire d'une autorisation d'expérimenter étendue à la chirurgie. L'obtention de cette dernière est soumise au suivi d'une formation spéciale à la chirurgie. Cette formation concerne les techniques chirurgicales et les soins préparatoires et postopératoires. Il s'agit d'une formation de spécialisation, en complément de la formation de niveau I. Les docteurs vétérinaires et les chirurgiens en médecine humaine sont exemptés de cette formation mais pas de la formation de niveau I et de la demande d'autorisation d'expérimenter étendue à la chirurgie, sauf s'ils travaillent sous la direction d'une personne titulaire de ce type d'autorisation. Cette formation peut être suivie par les agents ayant la qualification de niveau II pour l'apprentissage de la technique mais les protocoles restent alors sous la responsabilité d'une personne titulaire d'une autorisation étendue à la chirurgie.

PRATIQUE QUOTIDIENNE POUR LES COMITÉS D'ÉTHIQUE : TÉMOIGNAGE

de Raymond Nowak

Président du CREEA "Centre Limousin" 2002-2009, UMR 6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements INRA-CNRS Univ. de Tours-Haras Nationaux. Centre INRA de Tours à Nouzilly

Les questions éthiques ne peuvent plus être perçues comme gravitant en périphérie des sciences mais comme une part intégrante du devoir scientifique. Il est ainsi crucial que nous prenions en compte la validité de l'expérience projetée autant que la légitimité de ce qu'elle implique pour l'animal.

Une concertation entre l'INRA, l'INSERM, le CEA et le CNRS sous l'égide du Ministère de la Recherche a eu pour objectif la mise en place par les établissements publics, de Comités Régionaux d'Éthique en matière d'Expérimentation Animale (CREEA) susceptibles de répondre aux interrogations des chercheurs et aux attentes morales de la société. L'ensemble du dispositif des CREEA mis en place il y a quelques années a été amené à évoluer. Il a été remplacé par les CEEA en 2008, c'est-à-dire que les Comités ont perdu leur caractère régional mais globalement leur mission reste inchangée : émettre un avis éthique motivé sur les protocoles après s'être assuré de leur conformité avec les bonnes pratiques de l'expérimentation animale. La législation française n'impose pas aux expérimentateurs une autorisation du protocole avant chaque expérimentation ; la saisine du Comité d'Éthique est donc à l'heure actuelle facultative et se fait par voie électronique. La taille des CREEA impliquait souvent un fonctionnement par courrier électronique. En effet, en l'absence d'un budget de fonctionnement du Comité, il était difficilement possible de réunir régulièrement sur un même site des personnes éparpillées sur plusieurs départements (le CREEA Centre-Limousin concernait les villes d'Orléans, Tours, Poitiers et Limoges). L'avis final est émis une fois que le chercheur a répondu aux remarques éthiques (voire réglementaires) du comité. Les règles relatives à la protection animale sont attentivement prises en compte par le Comité. Tout animal vertébré étant considéré légalement comme un être sensible, il est demandé au chercheur de placer l'animal dans des conditions compatibles avec les impératifs biologiques de son espèce. L'expérimentateur a donc le devoir de s'assurer que sa santé et son bien-être ne sont pas inutilement menacés. Si les contraintes expérimentales ne permettent pas de suivre toutes les recommandations du comité, un examen du dossier est effectué. Celui-ci aide le chercheur à élaborer les

conditions expérimentales alliant au mieux objectifs scientifiques et exigences éthiques. Le travail réalisé sur des mammifères de grande taille (porcins, ovins, caprins), comme c'est le cas à l'INRA, demande une gestion particulière des animaux (Nowak et Cognié, 2008). En effet, les contraintes réglementaires actuelles liées à l'expérimentation ne sont pas adaptées aux espèces dites de rente mais concernent l'animal de laboratoire (rongeurs, lagomorphes, primates, chiens, chats...). Une réglementation spécifique aux animaux de ferme et aux mini-porcins se mettra en place prochainement. À l'heure actuelle, les locaux destinés à héberger des animaux de ferme doivent au moins respecter les normes établies dans la Convention européenne sur la protection des animaux dans les élevages.

S'il est difficile d'évaluer l'intensité de la douleur ressentie par l'animal au cours d'une expérience, il ne faut pas sous-estimer sa sensibilité, le doute doit bénéficier à l'animal. Les protocoles incluant de la chirurgie expérimentale sont susceptibles d'occasionner des douleurs (de modérées à sévères) : l'expérimentateur a par conséquent le devoir de soustraire l'animal expérimental à cette expérience douloureuse, par une prévention et un traitement adéquat. Cette nécessité amène l'expérimentateur à être capable d'identifier une expression de la douleur par l'animal, à pouvoir la quantifier, et à présenter au Comité d'Éthique la façon dont il compte la gérer. En fonction de l'intensité du phénomène douloureux, il sera demandé à l'expérimentateur de prescrire un traitement antalgique, de mettre en œuvre une anesthésie et parfois de se résoudre à euthanasier l'animal pour abrégé ses souffrances. Là-encore, les données concernant les animaux de ferme sont très parcellaires et il convient d'apporter une attention particulière à leur égard. Ceux-ci entrent en salle de mise à jeun la veille de l'intervention (l'avant-veille pour les chirurgies du tractus digestif) et ce, en limitant le stress autant que possible. Compte tenu de leur taille, suite à l'anesthésie, les animaux sont manipulés par palan et placés sur des chariots pour limiter au maximum les risques de choc et de manipulations potentiellement traumatisantes. Une combinaison alliant traitements antibiotiques, anti-œdémateux et analgésiques fera partie intégrale des soins per et post-opératoires. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens utilisés seuls sont acceptables pour les chirurgies les moins invasives. Ils sont associés aux morphiniques pour les chirurgies les plus invasives. Bien que non obligatoire, une des recommandations est d'améliorer ces traitements analgésiques notamment par la mise au point, chez les petits ruminants et les porcins, de protocoles per-opératoires associant la kétamine, la lidocaïne et la morphine

en perfusion continue. Ces soins se poursuivent dans la surveillance du réveil, de la reprise alimentaire et dans le suivi clinique tout en limitant au maximum la composante stress préjudiciable à l'animal et l'expérimentateur (incidences sur les paramètres physiologiques). Il est en outre indispensable, pour un suivi opératoire de qualité, d'avoir de bonnes interactions entre les chercheurs et toute l'équipe technique et surtout de remettre en question quotidiennement l'activité du personnel par des formations régulières.

Le défaut d'un mode de fonctionnement à distance des CREEA a été l'absence de discussion et d'enrichissement mutuel qui auraient pu naître entre membres du comité si les échanges avaient eu lieu autour d'une table. En effet, les échanges de courriers électroniques entre le demandeur et les membres du comité qui le questionnent, sont rendus anonymes en transitant par l'intermédiaire du président et ne sont donc pas partagés par tous. Cela entraîne par conséquent deux règles pour le fonctionnement du comité : une connaissance de la part des membres des contraintes réglementaires françaises (qui sont souvent méconnues par le scientifique) et une harmonisation des critères permettant une évaluation éthique du dossier. Une formation des membres du comité d'éthique apparaît ainsi indispensable dans la mesure où ceux-ci viennent d'horizons divers. Une telle formation n'avait pas été envisagée lors de la mise en place des CREEA, ce qui est à déplorer. Celles-ci sont actuellement disponibles et je ne saurais trop encourager les nouveaux membres des comités de les suivre. Ainsi, il me semble qu'un fonctionnement harmonieux et efficace du comité d'éthique repose sur ces deux aspects : une formation commune et des rencontres locales. À cela, il faut penser à l'avenir : l'évaluation des protocoles expérimentaux deviendra irrémédiablement obligatoire. Il faut donc songer à pérenniser de telles structures et inciter au maximum les chercheurs à solliciter l'avis d'un comité d'éthique. En matière d'expérimentation animale, les contraintes réglementaires et les exigences sociétales ne feront que se renforcer. ■

raymond.nowak@tours.inra.fr

Référence

Nowak R., Cognié J. 2008. Les modèles d'animaux de ferme utilisés en chirurgie expérimentale : intérêt et contraintes, aspects éthiques. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 161 (5), 417-424.

L'EXPÉRIMENTATION ANIMALE AU QUOTIDIEN

L'exemple de la plate-forme d'hébergement et d'explorations fonctionnelles de l'IFR des Neurosciences de Strasbourg

de *Sophie Reibel Foisset*

Vétérinaire, Directrice technique et sanitaire

Depuis plusieurs années, l'Institut Fédératif des Neurosciences de Strasbourg, qui regroupe une trentaine d'unités de recherche académiques (Inserm, CNRS et Université de Strasbourg) et du secteur privé, poursuit une politique d'accessibilité à des plates-formes technologiques performantes. La plate-forme d'hébergement et d'explorations fonctionnelles a ainsi été ouverte en 2006 et labellisée en 2009 au niveau national par le groupement d'intérêt scientifique pour les infrastructures en biologie, santé et agronomie (GIS IBISA), pour l'originalité des services proposés. Ces services s'inscrivent dans le cadre des spécificités des laboratoires strasbourgeois travaillant en neurosciences (utilisation de lignées de rongeurs- rats et souris- génétiquement modifiés, étude des rythmes circadiens et saisonniers, explorations fonctionnelles et comportementales, cognisciences, imagerie).

La plate-forme est hébergée au sein de l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives sur le campus universitaire central de Strasbourg. Sur une surface de 1400 m², elle se compose de trois unités distinctes: une animalerie conventionnelle spécialisée dans l'étude des rythmes biologiques ou "Chronobiotron" (19 pièces d'élevage, 9 pièces d'expérimentation, 600 m²), une animalerie transgénique pour le maintien et l'expansion de lignées de souris mutantes naturelles ou génétiquement modifiées (6 pièces d'élevage, 480 m²) et une zone sécurisée de niveau 3 (animalerie et laboratoire A3/L3, 150 m²) pour la manipulation d'agents pathogènes. Deux équipes de zootechniciens affectés spécifiquement soit au Chronobiotron (4 zootechniciens), soit aux animaleries transgéniques et A3 (3 zootechniciens) assurent l'entretien des animaux et de la plate-forme, sous la direction d'une directrice scientifique du Chronobiotron et d'une directrice technique et sanitaire.

La spécificité du Chronobiotron repose d'une part sur les espèces de rongeurs (2 000 animaux) qui y sont élevées pour la chronobiologie : des modèles nocturnes (rats, souris), un modèle de rongeur diurne (*Arvicanthis ansorgei*), des modèles saisonniers (hamsters dorés et hamsters sibériens), un modèle d'horloge circannuelle (hamster d'Europe). Par ailleurs, les études de chronobiologie exigeant de travailler dans des conditions environnementales (température, hygrométrie, photopériode) rigoureusement contrôlées, ces paramètres sont régulés

et enregistrés en permanence par une gestion technique centralisée informatisée. Toutes les pièces sont équipées de néons rouges offrant aux expérimentateurs la possibilité de travailler pendant la phase nocturne du cycle jour/nuit. Dans certaines pièces, il est possible de mettre en œuvre un allumage et une extinction progressifs des lumières afin de mimer l'aube et le crépuscule et s'approcher au mieux des conditions photopériodiques naturelles. Enfin, des chambres climatiques, dans lesquelles la température peut être maintenue à 6°C, permettent de placer les hamsters dans des conditions d'hibernation. Dans les pièces d'expérimentation, de multiples paramètres physiologiques peuvent être enregistrés par télé-métrie 24h/24h dans toutes ces espèces et chez l'animal libre de ses mouvements : température corporelle, activité locomotrice (par des émetteurs implantés ou de manière non invasive grâce à des capteurs infra-rouges), activité de roue, électroencéphalogramme, électro-oculogramme, électromyogramme, électrocardiogramme. Le Chronobiotron propose également la préparation chirurgicale d'animaux pour le recueil séquentiel d'échantillons sanguins permettant le suivi nyctéméral de certaines hormones, la microdialyse intracérébrale et l'administration chronique de substances pharmacologiques. Ces techniques peuvent être couplées temporellement à des enregistrements téléométriques réalisés en parallèle sur le même animal. Enfin, dans le cadre d'études sur les comportements alimentaires et le rythme circadien, des cages équipées de mangeoires à fermeture programmable ont été développées. Toutes ces caractéristiques font du Chronobiotron un outil unique en Europe pour les études en chronobiologie. À ce titre, de nombreuses collaborations scientifiques nationales et internationales reposent sur les modèles animaux et les possibilités techniques offertes par le Chronobiotron.

La zone transgénique permet l'élevage de lignées de souris et de rats génétiquement modifiés, avec une capacité maximale de 5 000 individus. Actuellement une quarantaine de lignées sont hébergées et les animaux sont produits selon les demandes des chercheurs, ce qui requiert des interactions permanentes afin d'adapter au plus près les programmes d'élevage en fonction des besoins, d'optimiser les places d'hébergement disponibles et de ne pas produire des animaux inutilement. Un nombre important de ces animaux est transféré pour des études au Chronobiotron.

Enfin, la zone A3/L3 permet la manipulation d'agents infectieux transmissibles et pathogènes pour l'homme, tels les prions ou le virus du SIDA. Dans cette zone, l'animalerie est contiguë au laboratoire équipé pour des

protocoles *in vivo* ou *post mortem*. Des procédures strictes de travail au sein de cette zone et d'élimination des déchets assurent la protection du personnel et de l'environnement.

Les contraintes sanitaires et réglementaires conditionnent le fonctionnement général de la plate-forme. L'organisation quotidienne du travail des zootechniciens est liée aux statuts sanitaires des différentes zones. Le Chronobiotron est une animalerie fonctionnant selon un mode conventionnel, dans laquelle les animaux sont hébergés dans des cages ouvertes et l'accès des chercheurs et étudiants autorisé. À l'inverse, les zones transgéniques et A3 ont un statut EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques) dont la conservation impose la mise en œuvre de barrières : équipements de protection individuelle pour les personnels, décontamination du matériel, des litières, de l'eau de boisson et des aliments à leur entrée en zone, hébergement en portoirs ventilés et change sous hotte. L'introduction d'animaux (hors éleveurs agréés) ne s'effectue qu'après vérification des bilans sanitaires de l'animalerie d'origine et séjour en quarantaine, avec des souris sentinelles dont le statut sanitaire à l'issue d'une période de contact d'au moins 6 semaines conditionne le transfert en zone. L'accès des zones transgéniques et A3 est strictement réservé aux zootechniciens et restreint à un nombre aussi limité que possible de chercheurs. La zone laverie de la plate-forme, commune aux animaleries conventionnelles et protégées, impose une gestion rigoureuse des flux entrants et sortants et des décontaminations régulières des locaux. Cette configuration particulière de la plate-forme exige de réaliser des contrôles sanitaires réguliers (bisannuels au Chronobiotron et trimestriels pour les zones protégées). Le maintien du statut sanitaire EOPS de la zone transgénique est essentiel pour permettre l'exportation de souris vers d'autres animaleries dans le cadre de collaborations scientifiques. Le suivi sanitaire de l'ensemble des animaux, en vérifiant l'absence de pathogènes, permet d'exclure des interférences expérimentales par altération de la réactivité biologique ainsi que le risque zoonotique (relativement limité chez les rongeurs de laboratoire).

La réglementation exhaustive sur l'élevage d'animaux de laboratoire et leur utilisation à des fins expérimentales impacte tous les secteurs et activités d'une animalerie au quotidien. Les locaux disposent ainsi des agréments réglementaires et font l'objet d'inspections périodiques par les Services Vétérinaires. Les personnels zootechniques ont suivi la formation à l'expérimentation animale de niveau 2 et les responsables sont titulaires de l'autorisation de niveau 1 étendue à la chirurgie. Cette autorisation doit être renouvelée tous les 5 ans. Par ailleurs, la

détention et l'élevage d'espèces non domestiques telles que les hamsters sibériens, européens et les arvicanthis, requièrent une autorisation d'ouverture des locaux ainsi qu'un certificat de capacité pour les personnels directement en charge des colonies. La réglementation exige l'inscription de tous les mouvements d'animaux dans des registres d'entrée et sortie. Ces registres, actuellement sous forme papier, évolueront dans le futur vers un support informatisé associé aux fichiers dans lesquels tous les animaux de la plate-forme sont identifiés ce qui allégera le travail de saisie des zootechniciens. La proposition de révision de la directive 86/609, adoptée par le parlement européen en mai 2009, détaille notamment la taille des cages allouées aux animaux selon les espèces, leurs poids et nombres. La plate-forme a fait le choix d'anticiper la mise en œuvre de ces recommandations dont certaines diffèrent de la réglementation actuellement en vigueur.

En 2008, 53 protocoles expérimentaux ont été réalisés au Chronobiotron, 22 dans la zone transgénique et 5 dans le A3/L3. Environ 10 % d'entre eux ont été soumis au Comité d'Éthique. L'incitation à la saisine du Comité d'Éthique, qui deviendra obligatoire à moyen terme, fait partie des objectifs d'amélioration de la qualité et de la technicité des services apportés par la plate-forme à la communauté des chercheurs. ■

sophie.reibel-foisset@neurochem.u-strasbg.fr

LA SITUATION AUX USA : TÉMOIGNAGE

de Sébastien Bouret

Membre de l'Institutional Animal Care and Use Committee of Childrens Hospital of Los Angeles (USA), Inserm U837, Lab. International Associé Neurobase (Inserm/University of Southern California), Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, Univ. de Lille 2

De l'autre côté de l'Atlantique, toute expérimentation sur animal vertébré (y compris les poissons) doit être approuvée par un comité spécialisé appelé "IACUC" (Institutional Animal Care and Use Committee). Les IACUC ont été créés en 1971 par le National Institute of Health (NIH). Depuis 1979, ils sont obligatoires dans tous les centres de recherche Américains recevant des financements fédéraux (par exemple des financements du NIH) et où l'expérimentation animale est pratiquée. Ces comités assurent plusieurs fonctions : examen des protocoles expérimentaux, visite des locaux (bisannuelle) et vérification des formations des personnes. Ces comités sont composés d'au moins 5 membres désignés par l'institution de tutelle, dont un

vétérinaire possédant des compétences chez les espèces étudiées (souris, rats, lapins...), un ou plusieurs scientifiques familiers avec l'expérimentation animale, et une personne du grand public indépendante de l'institution de tutelle qui permet d'apporter un regard objectif. Lors de l'évaluation des protocoles, il est demandé aux membres de l'IACUC de s'assurer que les expérimentations proposées répondent à la règle des "3R" (Replace, Reduce, and Refine : cf page 11). De plus, chaque protocole soumis doit être justifié scientifiquement, plus précisément, il doit démontrer que les expériences proposées participent à l'avancement des connaissances biomédicales et ne dupliquent pas des données déjà publiées. En dehors de ces exigences et des délais inexorablement liés au temps nécessaire à l'évaluation des protocoles (il faut compter en moyenne 1 à 2 mois entre la soumission des protocoles et leur approbation), l'existence des IACUC n'a pas globalement d'impact négatif sur l'activité de recherche des laboratoires. Au contraire, de part sa capacité à émettre des conseils, l'IACUC peut aider les chercheurs à optimiser leurs expérimentations ou éviter certaines erreurs expérimentales. Il est cependant important de respecter à la lettre le protocole soumis. En effet, la loi fédérale américaine oblige l'IACUC de rapporter aux autorités de contrôle (NIH) tout écart par rapport au protocole. Les sanctions appliquées peuvent aller jusqu'à la suppression des financements pour le laboratoire en question. En conclusion, même si la soumission de protocole auprès de l'IACUC peut parfois s'avérer lourde administrativement, l'assurance que les expériences proposées soient considérées, par un comité indépendant, comme importantes pour la recherche biomédicale et conformes au bien-être animal s'avère indispensable dans un pays où le grand public est de plus en plus sensibilisé aux problèmes d'expérimentation animale (via la montée en puissance des associations de protection animale). ■

sbouret@chla.usc.edu

Comme on l'a vu dans ce dossier, les réglementations et les mentalités ont considérablement évolué au cours des dernières années dans le domaine de l'expérimentation animale et il est fort probable que cette évolution se poursuive. Le Centre Commun de Recherche de la Commission Européenne a signé tout récemment (le 27 avril 2009 à Bruxelles) un accord avec d'autres instances internationales (États-Unis, Japon, Canada) dont la finalité est la validation de méthodes de substitution à l'expérimentation animale (IP/09/643). Le premier septembre 2009, la Commission Européenne (représentée par Janez Potocnik, commissaire européen chargé de la science et

de la recherche, et Günter Verheugen, vice-président de la Commission) et l'industrie cosmétique européenne (représentée par M. Bertil Heerink, directeur général de l'association européenne de l'industrie cosmétique) se sont engagées à cofinancer à hauteur de 50 millions d'euros les projets de recherche visant à réduire le recours à l'expérimentation animale. Sur 20 ans, la contribution de l'Union Européenne à la recherche sur des méthodes de substitution, financée au titre du programme-cadre européen pour la recherche et le développement technologique, s'est élevée à environ 200 millions d'euros. Le Centre Commun de Recherche de la Commission héberge aussi le Centre Européen pour la Validation de Méthodes Alternatives (ECVAM). Le rapport de synthèse "Alternative Testing Strategies", publié en 2009 par la Commission Européenne peut être consulté à l'adresse suivante : <http://cordis.europa.eu/documents/documentlibrary/106691831EN6.pdf>

D'ores et déjà, certains envisagent une véritable mutation vers une recherche quasiment dépourvue d'investigation chez l'animal, une idée à laquelle beaucoup de chercheurs ne croient pas mais qui peut trouver un écho favorable dans la société. Nous avons bien assisté au cours de ces dernières années à l'abandon pratiquement général de l'utilisation des traceurs radioactifs dans nos protocoles, une idée à laquelle les chercheurs ne croyaient pas non plus il y a une trentaine d'années.

Les lecteurs désirant plus d'informations peuvent consulter le site du Bureau de l'Expérimentation Animale de l'Inserm à l'adresse suivante : www.inserm.fr/fr/outils_recherche/qualite_recherche_pre_clinique/beal ainsi que celui consacré à l'expérimentation animale par le CNRS, à l'adresse suivante : <http://ethique.ipbs.fr/sdvlindex.html> qui nous ont été très utiles pour l'élaboration de ce dossier. ■

Références

- (1) *Rapport de la Commission au Conseil et au Parlement Européen : Cinquième rapport sur les statistiques concernant le nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales et à d'autres fins scientifiques dans les États membres de l'Union Européenne : {SEC (2007)1455}.*
- (2) *Hall, M., A critical and experimental essay on the circulation of the blood. R.B. Seeley & W. Burnside Editors, London, 1831. (Cet ouvrage peut être consulté en "Open Library" à l'adresse suivante): www.archive.org/details/criticalexperime00halluoft*
- (3) *Russel, W.M.S. and Burch, R.L. The principles of humane experimental technic. Methuen & Co Ltd Editors, London, 1959.*