

Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale

(Articles R214-134 à 136 du Code rural et de la pêche maritime)

Membres du Comité (Arrêtés du 02 juillet 2019, 03 décembre 2021, 24 février 2022)

Pierre Mormede (Président), Nicolas Guy, Françoise Médale, Valérie Nivet-Antoine, Michel Tarpin, Patrick Gonin, Sophie Picavet, Véronique Mary, Sylvie Duclaux, Bijan Ghaleh, Francine Behar-Cohen, Nicolas Dudoignon, Jean-Claude Desfontis, Emmanuel Picavet, Jean-Luc Guichet, Edwige Auchard, Fabien Marchadier, Gérard Raphaël Larrère, Jocelyne Porcher, Sarah Bonnet, Patricia Lortic, Georges Chapouthier, Amélie Romain, Léa Briard, un représentant du ministre chargé de la Recherche et un représentant du ministre chargé de l'Agriculture.

Avis sur l'utilisation d'anticorps d'origine animale ou non animale

Validé en réunion plénière du 07 novembre 2022

Membres du groupe de travail :

Patrick Gonin (animateur), Véronique Mary, Patricia Lortic, Sarah Bonnet, Pierre Mormede, Sandryne Bruyas (MASA), Nicolas Dudoignon.

Professionnels auditionnés par le groupe de travail

- Thomas Bouquin, Sanofi
- Franck Perez, Institut Curie
- Patrick Hardy, Centre Lago
- Stéphanie Antil-Delbeke, Bio-Rad
- Caroline Davayat, Biomérieux

Avis sur l'utilisation d'anticorps d'origine animale ou non animale

Exposé des motifs

En 2020, le laboratoire de l'Union Européenne pour les alternatives aux tests sur animaux (EURL ECVAM) a publié une recommandation sur l'utilisation d'anticorps d'origine non animale (1). Cette démarche s'inscrit pleinement dans l'objectif du remplacement des animaux en expérimentation. La conclusion résumée du document indique qu'il faudrait arrêter d'utiliser des animaux pour la fabrication ou la production d'anticorps, quelle qu'en soit la raison (développement ou production) liée à la recherche, à des besoins réglementaires, en diagnostic ou pour des applications thérapeutiques. Il est ajouté qu'il ne devrait plus être possible d'autoriser des projets utilisant des animaux à des fins scientifiques pour obtenir des anticorps par immunisation d'animaux sans une justification scientifique robuste et légitime. A la suite de cette recommandation, de nombreux avis ont été émis par différents organismes européens représentant des chercheurs aussi bien académiques que privés (revus par la *Deutsche Gesellschaft für Immunologie* (2)).

Le CNREEA a souhaité faire un état des lieux du développement, de la production et de l'utilisation des anticorps en France, particulièrement d'origine animale, et formuler un avis adapté au contexte national. Cet avis se concentrera en priorité, mais ne se limitera pas, aux situations relevant d'autorisations de projets utilisant des animaux à des fins scientifiques.

État des lieux

Un état des lieux le plus exhaustif possible de la situation en France a été réalisé par le moyen d'un questionnaire qui a été diffusé très largement, s'intéressant aussi bien aux anticorps d'origine animale que non animale. Les réponses obtenues sont donc parvenues aussi bien de personnes faisant de la biologie cellulaire ou moléculaire, que d'utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques. Il ressort de ce questionnaire une très grande variété d'applications et d'utilisations d'anticorps d'origine animale ou non. L'état des lieux suivant s'intéresse tant aux techniques de création que de production d'anticorps.

Utilisation et production des anticorps d'origine animale

Produits thérapeutiques

Si les anticorps à visée thérapeutique et la plupart des anticorps utilisés en diagnostic sont produits par des méthodes non animales (mais souvent initialement développées chez l'animal), il existe actuellement des exceptions, et il peut y avoir des situations particulières ou d'urgence nécessitant une production chez l'animal. Certains médicaments utilisés sous AMM (autorisation de mise sur le marché) ou ATU (autorisation temporaire d'utilisation) ont pour principe actif des anticorps polyclonaux nécessairement produits par immunisation d'animaux (lapins, chevaux, moutons...), en absence d'alternative satisfaisante. Sans donner une liste exhaustive, ils entrent essentiellement dans deux catégories : les sérums antivenimeux ou anti-toxines bactériennes (souvent utilisés sous ATU), et les anti-thymocytes utilisés principalement comme thérapeutique antirejet de greffe (exemples : Thymoglobuline[®] en France, Atgam[®], Grafalon[®]) sous AMM.

Produits diagnostiques

Des anticorps obtenus par immunisation d'animaux sont utilisés depuis des années dans les trousseaux commerciaux agréés de diagnostic de maladies infectieuses humaines ou animales. Même s'il existe

dans ce domaine de nouveaux développements visant au remplacement des anticorps actuellement utilisés par des anticorps produits *in vitro*, cela n'a pas encore abouti.

Il faut noter ici que pour les produits réglementés à visée thérapeutique ou diagnostique, toute modification de protocole de production nécessite une modification des autorisations correspondantes, éventuellement dans un grand nombre de pays. En sus du produit lui-même, c'est sa méthode de production qui fait l'objet d'une autorisation.

Utilisations en recherche

Les anticorps d'origine animale sont également largement utilisés en recherche en routine dans les techniques ELISA, Western-blot, immunoprécipitation, cytométrie de flux, etc. Une très grande partie de ces anticorps utilisés en recherche, disponibles sur catalogue, est fabriquée hors UE et en majorité par immunisation d'animaux. Un des importants marchés dans ce domaine est aussi celui des anticorps secondaires dirigés contre les anticorps d'une espèce donnée, utilisés en recherche et en diagnostic, dont l'anatomie pathologique (immunomarquages par exemple).

Pour divers travaux de recherche, des anticorps à façon sont indispensables. Il peut s'agir par exemple d'avoir un antisérum polyclonal contre un nouveau virus ou de développer des anticorps monoclonaux contre les différents épitopes d'une protéine purifiée. Dans ce cas, les anticorps peuvent être produits en interne (laboratoire lui-même) ou en externe (sociétés spécialisées, sous-traitants). Concernant les anticorps monoclonaux utilisés dans la recherche, quand ils sont d'origine animale, la principale technique de production utilisée est celle de l'injection intrapéritonéale d'hybridome après conditionnement, plus connue sous le nom de méthode par production d'ascite. Cette méthode permet en effet d'obtenir rapidement des quantités importantes d'anticorps monoclonaux. Elle a déjà fait l'objet, en 2017, d'une recommandation du CNREEA sur sa mise en œuvre (3).

Alternatives aux anticorps produits chez les animaux (*phage display* et production *in vitro*)

Anticorps monoclonaux

Fabrication d'anticorps synthétiques d'emblée (anticorps sources) : techniques de *phage display*

A l'heure actuelle, il existe dans le monde plusieurs collections très étendues d'anticorps synthétiques ((4) (5)). Le criblage de protéines d'intérêt contre ces collections peut permettre d'obtenir des fragments d'anticorps ou des *nanobodies* ciblés contre des parties de ces protéines. Ces molécules diffèrent des anticorps produits naturellement par un organisme vivant sur deux propriétés : leur classe (type d'anticorps : IgG, IgM, IgA, etc.) et leur maturation (modifications post-traductionnelles). Cela nécessite un travail secondaire *in vitro* pour améliorer leur spécificité et leur sélectivité. En revanche, les affinités sont généralement comparables. Il est aussi à noter qu'il peut être plus difficile d'obtenir des anticorps synthétiques contre des protéines dénaturées au contraire des protéines natives. La qualité et la diversité des anticorps proposés dans chaque collection est variable.

Production d'anticorps in vitro

Que les anticorps sources aient été d'emblée synthétiques (par criblage de collections de phages) ou initialement obtenus par immunisation d'animaux, il est possible de produire ces anticorps par la suite en systèmes de culture cellulaire. C'est d'ailleurs ce qui est majoritairement fait pour les anticorps thérapeutiques (dont la très grande majorité dérive d'anticorps sources produits par immunisation d'animaux, puis humanisation par clonage moléculaire et production *in vitro*). La fabrication d'anticorps à visée thérapeutique entièrement synthétiques (de l'anticorps source au médicament autorisé) est cependant possible, même si elle reste encore limitée (6).

Anticorps polyclonaux

Actuellement, des anticorps polyclonaux sont utilisés en recherche, en diagnostic et en thérapeutique. Ils sont tous d'origine animale, même s'il est possible en théorie, de créer des préparations « polyclonales » par mélange d'anticorps monoclonaux, eux-mêmes d'origine synthétique, mais ces mélanges (parfois appelés « multiclonaux ») ne reprennent jamais la totalité des performances des anticorps polyclonaux.

Conclusions

L'enquête effectuée ainsi qu'une revue de la littérature montrent que le remplacement des anticorps d'origine animale par des anticorps synthétiques a été initié depuis plusieurs années dans différents domaines mais que, dans l'état actuel de la technologie, il reste des situations dans lesquelles soit les anticorps synthétiques restent moins performants voire inadaptés donc inutilisables (anticorps dirigés contre des protéines dénaturées, anticorps anti-peptides), soit l'évolution vers l'utilisation d'anticorps d'origine non animale en production sera un processus de longue durée et les obstacles techniques subsistent (anticorps à usage thérapeutique ou diagnostic).

Recommandations

Considérant :

D'une part,

- *La nécessité de supprimer à terme l'utilisation des animaux en général et, dans le cas présent, pour la fabrication et la production d'anticorps ;*
- *Le développement des méthodes alternatives permettant d'éviter le recours aux animaux ;*
- *La diminution progressive des contraintes techniques liées aux méthodes alternatives.*

Et d'autre part,

- *Les limites et les freins actuels au remplacement par des méthodes alternatives (accès aux collections de phage-display, qualité variable de ces collections, délais nécessaires à l'enregistrement de nouveaux produits à usage réglementé) ;*
- *Le caractère encore inadapté en matière de performance des méthodes synthétiques dans certains cas ;*
- *Le risque avéré de délocalisation des productions dans des pays tiers dont les niveaux de protection des animaux sont moins élevés qu'en Europe.,*

Le Comité émet l'avis suivant :

Sur les pratiques ayant cours :

- L'approche *in vitro* sans recours aux animaux doit être la première option dans les nouveaux projets de recherche. L'utilisation des animaux pour la fabrication et/ou la production d'anticorps doit être démontrée comme incontournable dans toute demande d'autorisation de projet (en documentant les efforts concrets faits sur le terrain, et pas uniquement par des éléments théoriques ou bibliographiques), avant tout possible avis favorable d'un comité d'éthique puis autorisation. Une attention particulière doit être portée aux méthodes de raffinement. Le projet doit faire l'objet d'une appréciation rétrospective, explicitant en particulier les efforts faits pour remplacer l'utilisation des animaux au cours du temps. La durée

d'autorisation du projet doit être adaptée pour permettre une réévaluation régulière de ces efforts.

- La production de routine d'anticorps monoclonaux par la méthode d'ascite doit être fortement découragée. C'est une procédure sévère qui doit être pratiquée dans le strict respect de la recommandation du CNREEA de 2017 (3). Dans le cas où elle serait incontournable, le projet ne devrait pas être autorisé pour une durée supérieure à deux ans, permettant, une réévaluation rapide du maintien éventuel de sa pertinence grâce à l'appréciation rétrospective.
- Le caractère incontournable de l'utilisation de l'immunisation initiale (création de nouveaux anticorps contre une protéine d'intérêt par immunisation d'animaux, récupération de cellules, et création d'un hybridome par fusion (7)) pour l'obtention d'anticorps originaux monoclonaux en recherche doit s'appuyer sur une démonstration solide et robuste de l'impossibilité de recourir à la sélection d'éléments synthétiques obtenus par *phage-display*.
- L'adjuvant utilisé pour l'obtention d'anticorps polyclonaux chez l'animal doit être rationnellement choisi et l'utilisation d'adjuvant complet de Freund doit être réservée aux cas où elle est indispensable, du fait des effets secondaires documentés (8), et dans ce cas utilisé à une concentration inférieure à 0,1 mg/ml.

Sur les évolutions à venir :

- Les professionnels travaillant en recherche ou en diagnostic doivent prendre conscience de l'origine des anticorps qu'ils utilisent et privilégier le plus possible les anticorps synthétiques, non produits par immunisation d'animaux. La délocalisation de la production des anticorps chez des animaux n'est pas éthiquement acceptable.
- Les pouvoirs publics, les centres de recherche académiques aussi bien que privés et les sociétés savantes ont un rôle important à jouer pour soutenir – chacun dans leurs domaines de compétence – une évolution résolue vers la réduction de l'usage des anticorps d'origine animale :
 - En informant largement tous les utilisateurs d'anticorps sur les possibilités offertes par les approches *in vitro* n'ayant pas recours aux animaux et organisant des formations sur ce thème ;
 - En encourageant par des incitations fortes le développement de consortiums visant à recenser les collections existantes d'anticorps synthétiques, en incluant des annotations les plus complètes possibles, permettant d'avoir un indice de qualité de chaque anticorps recensé et de connaître ses utilisations possibles ou documentées ;
 - En encourageant aussi fortement le développement de plateformes ou de sociétés de prestation de services dans les domaines de la sélection d'anticorps synthétiques et de la production *in vitro* d'anticorps ;
 - En encourageant la recherche sur les performances des anticorps multiclonaux (mélanges de monoclonaux synthétiques) par rapport aux anticorps polyclonaux obtenus par immunisation d'animaux.
- Dans tous les cas l'utilisation des animaux faisant obligatoirement l'objet de demandes d'autorisations de projet, il serait utile que le ministère chargé de la Recherche mette en place une procédure permettant de recenser ces projets et les approches et techniques expérimentales sur lesquelles ils s'appuient. Ceci permettrait d'évaluer les progrès au fil du

temps et de réviser, le cas échéant, la présente recommandation qui doit être considérée comme évolutive.

Ces démarches s'inscrivent pleinement dans le souci de réduire l'utilisation des animaux à des fins expérimentales en les remplaçant par des approches alternatives chaque fois que cela est possible. Cet objectif ouvre par ailleurs de nouvelles opportunités pour la recherche et le développement dans le domaine biomédical. Le CNREEA assurera un suivi des progrès dans ce domaine et révisera régulièrement cette recommandation pour tenir compte des évolutions en matière d'approches alternatives.

Références :

1. Viegas Barroso JF, Halder ME, Whelan M. EURL ECVAM Recommendation on Non-Animal-Derived Antibodies [Internet]. JRC Publications Repository. 2020 [cited 2022 May 25]. Available from: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC120199>
2. Antikörper aus Tieren bleiben unverzichtbar in Forschung und Klinik [Internet]. DGFI. 2020 [cited 2022 May 25]. Available from: <https://dgfi.org/die-dgfi-kaempft-fuer-die-weitere-nutzung-von-in-tieren-generierten-antikoerpern-in-forschung-und-klinik-und-informiert-seine-mitglieder-ueber-die-wissenschaftsfeindliche-empfehlung-des-eu-referenzlab/>
3. CNREEA. Recommandation sur la production d'anticorps par liquide d'ascite chez la souris [Internet]. 2017 [cited 2022 May 27]. Available from: https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/sites/default/files/content_migration/document/2_RECOMMANDATION_CNREEA_ASCITE-_27_avril_2017_1417163.pdf
4. Lima WC, Gasteiger E, Marcatili P, Duek P, Bairoch A, Cosson P. The ABCD database: a repository for chemically defined antibodies. *Nucleic Acids Research*. 2020 Jan 8;48(D1):D261–4.
5. Moutel S, Bery N, Bernard V, Keller L, Lemesre E, de Marco A, et al. NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies. *eLife*. 2016 Jul 19;5:e16228.
6. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci*. 2020 Jan 2;27(1):1.
7. Chronopoulou E, Uribe-Benninghoff A, Corbett CR, Berry JD. Hybridoma Technology for the Generation of Rodent mAbs via Classical Fusion. In: Ossipow V, Fischer N, editors. *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2014 [cited 2022 Jun 13]. p. 47–70. (Methods in Molecular Biology). Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-992-5_4
8. Stills HF. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J*. 2005;46(3):280–93.

Glossaire :

Anticorps : Un anticorps est une molécule produite par le système immunitaire adaptatif dans un organisme vivant pour détecter et neutraliser de manière spécifique les agents étrangers (antigènes) à l'organisme. C'est une immunoglobuline sécrétée par les plasmocytes, stade final de différenciation

des lymphocytes B. L'immunisation d'un organisme consiste à lui administrer un antigène afin de provoquer la production d'anticorps (qui est le produit recherché).

Anticorps monoclonal : Les anticorps monoclonaux sont des anticorps produits naturellement par une même lignée de lymphocytes B activés ou plasmocytes, reconnaissant le même épitope d'un antigène.

Sérum polyclonal : Il s'agit du résultat de la réponse immunitaire à une stimulation par une protéine contenant plusieurs épitopes. La réponse immunitaire va induire naturellement la production d'anticorps contre plusieurs épitopes, résultant de l'expansion de plusieurs clones de plasmocytes. C'est la réponse normale à l'exposition d'un organisme à un antigène étranger.

« Nanobody » : C'est un anticorps à chaîne unique (ils sont beaucoup plus petits que les anticorps communs, qui ont deux chaînes légères et deux chaînes lourdes). Ils ont été découverts chez les camélidés, mais sont maintenant synthétisés *in vitro* et peuvent être humanisés et recombinés pour constituer des anticorps communs.

Épitope : Un épitope est la partie singulière d'une protéine qui peut être reconnue par la partie variable d'un anticorps ou d'un récepteur membranaire des lymphocytes B (BCR) et lymphocytes T (TCR), pour déterminer si elle appartient au domaine du soi ou au domaine du non-soi (c'est-à-dire étrangère à l'organisme).

Affinité d'un anticorps : L'affinité est l'attraction spécifique entre un anticorps et un antigène. L'affinité est variable selon les couples anticorps/antigène, la maturation post-traductionnelle des anticorps et les conditions du milieu (pH, force ionique, température).

Classe d'un anticorps : Il existe 5 classes d'immunoglobulines (A, D, E, G, et M). Les régions constantes des chaînes lourdes déterminent la catégorie d'immunoglobuline à laquelle appartient l'anticorps. La catégorie d'immunoglobuline est aussi appelée isotype.

Maturation des anticorps : La maturation d'affinité est un processus spécifique de la réponse immunitaire adaptative conduisant à la production par les lymphocytes B d'immunoglobulines d'affinité croissante pour l'antigène. Ces processus peuvent être mis en œuvre *in vitro* dans certains cas.

Phage-display : L'exposition sur phage est utilisée pour le criblage à haut débit mettant en jeu des interactions protéiques. Une collection de protéines de taille très étendue est constituée (par exemple de *nanobodies* synthétiques), pour mimer le répertoire de reconnaissance des protéines du non-soi par le système immunitaire. L'exposition de cette collection à une protéine d'intérêt permet de déterminer les *nanobodies* qui interagissent avec la protéine à étudier (en ayant de ce fait la séquence protéique de ces *nanobodies*). Par la suite, il est possible de reconstruire des anticorps complets humanisés, par synthèse *in vitro*.

Hybridome : Un hybridome est une cellule hybride provenant de la fusion artificielle de cellules lymphoïdes normales de mammifères et de cellules myélomateuses de tumeurs malignes du système immunitaire. L'hybridome cumule les propriétés des deux cellules de départ : production spécifique d'anticorps pour le lymphocyte (monoclonal) et immortalité pour la cellule cancéreuse.

Ascite : L'ascite est une accumulation de liquide dans l'abdomen, plus précisément dans la cavité péritonéale. Dans le cas présent, il s'agit d'une réaction inflammatoire déclenchée par des molécules inflammatoires permettant d'implanter un hybridome immortalisé sécréteur d'anticorps

monoclonaux dans la cavité péritonéale d'une souris. Le liquide d'ascite est ensuite recueilli par ponction, et il contient en général de grandes quantités d'anticorps monoclonal.

- :- :- :- :- :- :- :- :- :- :-