

Méthodes alternatives en expérimentation animale :

**Cas concrets d'outils d'évaluation *in vitro* /
in vivo et de méthodes de prédiction *in silico***

12 mai 2011

Contact presse

Aurélie PREVOT

Tél: 03 44 55 63 01

Mob: 06 20 90 03 48

Aurelie.Prevot@ineris.fr

L'INERIS et les méthodes alternatives

Le recours à des méthodes alternatives en expérimentation animale est aujourd'hui une nécessité, eu égard notamment aux exigences du règlement REACH qui requiert des résultats rapides et fiables sur les propriétés toxiques et écotoxiques des substances chimiques. De plus, elles sont nécessaires pour répondre aux préoccupations sociétales autour d'une démarche éthique en expérimentation animale. Le règlement REACH et la directive sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques ne visant pas la suppression des essais, les méthodes alternatives doivent permettre de satisfaire un ou plusieurs principes des « 3R » : substitution (remplacer les modèles animaux à chaque fois possible), réduction (réduire le nombre d'animaux en expérimentation), raffinement (optimiser la méthodologie appliquée aux animaux).

Pour une utilisation dans un cadre réglementaire, ces méthodes doivent être reconnues ou validées. La validation consiste tout d'abord à prouver le concept, c'est-à-dire que la méthode répond aux résultats souhaités. C'est une étape scientifique réalisée par les pairs. La validation dite « réglementaire », par exemple par l'OCDE, rend éligible l'utilisation d'une méthode dans un dossier. L'INERIS a un rôle dans la reconnaissance des méthodes, tout d'abord la validation du concept par les chercheurs. Mais l'Institut propose une avancée supplémentaire, face au besoin croissant de méthodes alternatives ; compte tenu du temps nécessaire à la validation « réglementaire » ; étant donné la nécessité d'utiliser en confiance ces méthodes dans d'autres contextes (développement de produits). Une approche s'inspirant de la normalisation ou de la certification volontaire, « reconnue » au sens du règlement du REACH, répond aux besoins exprimés par les industriels et la société.

En janvier 2010, la Ministre chargée de l'Ecologie a lancé officiellement le pôle national applicatif en toxicologie et écotoxicologie, en tant que centre de référence national des méthodes d'évaluation des substances chimiques alternatives aux essais sur animaux. Dans ce cadre, pour être acteur de la reconnaissance des méthodes alternatives, l'INERIS approfondit des connaissances et optimise des techniques prédictives.

L'INERIS travaille en toxicologie sur les méthodes de substitution *in silico*, fondées sur la bioinformatique (QSARs, PBPK). Les modèles pharmacocinétiques (PBPK) décrivent la dynamique des substances chimiques dans l'organisme. Ce type de méthode, dont le but est de prédire les effets des substances, est un outil précieux pour faire le lien entre les informations collectées *in vitro* ou *in vivo* et le devenir du composé chimique dans l'organisme. En collaboration avec l'Inserm, l'Institut a développé un modèle PBPK pour le benzo[a]pyrène (B[a]P), Hydrocarbure Aromatique Polycyclique cancérigène. Un autre exemple d'approche intégrée, couplant plusieurs méthodes, est illustré par les travaux de l'INERIS et de l'Inserm sur un médicament anti-cancéreux, l'ifosfamide.

En écotoxicologie, développer des tests sensibles et spécifiques aux espèces aquatiques est essentiel, car certaines molécules chimiques ont des effets plus importants chez le poisson que chez l'homme, notamment les perturbateurs endocriniens (PE). L'Institut a développé un test de criblage *in vitro*, utilisable comme méthode de substitution, à partir de lignées cellulaires de poisson, puis étudié les dérivés de benzophénone. Un autre test de criblage *in vivo* spécifique au poisson, qui fait partie des techniques de réduction, a été mis au point par l'Institut au sein du programme NEMO en partenariat avec le CNRS, l'Inserm et l'INRA. Il a été éprouvé avec l'éthynyl-oestradiol.

Quels objectifs pour les méthodes alternatives aujourd'hui ?

L'INERIS, acteur de la toxicologie prédictive, est pionnier sur les méthodes alternatives. Pour étudier des sources de danger plus nombreuses et variées (perturbateurs endocriniens, nanomatériaux...), l'expérimentation animale traditionnelle, utilisée pour prédire les risques liés à l'exposition aux agents étrangers à l'organisme vivant (« xénobiotiques » d'origine chimique, physique ou biologique), ne suffit pas. Le recours aux méthodes alternatives, exigence éthique est aussi une nécessité pratique.

Un contexte réglementaire influant : REACH et la directive sur la protection des animaux

L'émergence de la question des méthodes alternatives s'inscrit dans une évolution progressive des perceptions culturelles, qui se traduit, depuis le début du XIX^{ème} siècle, par une sensibilité sociale plus forte au bien-être animal et aux droits des animaux. La loi du 10 juillet 1976 est, en France, la première législation traitant de la protection de l'animal, qui a inspiré les dispositions actuelles du Code Rural réglementant l'ensemble des pratiques vis-à-vis des animaux.

Dans ce contexte, le souhait d'encadrer les pratiques liées à l'expérimentation animale a amené à deux considérations : éviter de recourir aux animaux à chaque fois que cela était possible ; lorsque cet usage ne peut être évité, définir le point limite de souffrance ou de détresse animale admissible selon les « 3R » énoncés par W.M.S. Russell et R.L. Burch.

Les « 3R » : principes éthiques de l'expérimentation animale

La règle des « 3R », élaborée en 1959 par Russell et Burch, constitue le fondement de la démarche éthique liée à l'expérimentation animale en Europe et en Amérique du Nord. Les bonnes pratiques en expérimentation animale s'appuie sur :

- *Reduce* : réduire le nombre d'animaux en expérimentation
- *Refine* : optimiser la méthodologie appliquée aux animaux, notamment les conditions de transport, élevage, hébergement, utilisation (limiter ou éviter la douleur et la souffrance subie par les animaux, notamment en fixant des points limites – critères d'interruption ou *end points*)
- *Replace* : remplacer les modèles animaux à chaque fois que possible par des méthodes *in vitro* (étude sur cellules humaines ou animales) ou *in silico* (modélisation mathématique avec l'aide de l'informatique)

Source Inserm

Les principes éthiques structurés par les « 3R » servent de base à la Directive 2010/63/UE du 22 septembre 2010 sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques¹. Applicable au 1^{er} janvier 2013, elle exige, pour une procédure donnée, que soient choisies en priorité les méthodes alternatives reconnues par l'UE, si elles existent. Le règlement REACH, en vigueur depuis le 1^{er} juin 2007, affiche la nécessité de « promouvoir le développement de méthodes alternatives » dans la procédure instituant l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et la restriction des substances chimiques. La réglementation sur les produits cosmétiques a, elle, planifié leur arrêt total².

Au-delà des seules considérations éthiques, les méthodes alternatives sont un atout pour l'efficacité de l'évaluation des substances. La prédictivité des études de toxicologie classique est imparfaite. Dans certains cas, la transposition à l'homme de résultats obtenus sur des animaux ne donne pas toujours des résultats vérifiés dans la réalité, le modèle animal n'étant pas strictement identique au modèle humain. L'utilisation de méthodes alternatives permettrait d'améliorer la prédiction des dangers pour l'homme et ainsi de mieux définir le seuil d'exposition acceptable. Pour les industriels, elles constituent un avantage en termes d'efficacité aussi bien que de coût³.

¹ Cette directive est issue de la révision de la Directive 86/609/CEE du 24 novembre 1986 transposée en droit français dans le Code Rural.

² Directive 76/768/CEE du Conseil du 27 juillet 1976 concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux produits cosmétiques et Règlement CE 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques.

³ Les essais *in vivo* sont longs et peuvent représenter jusqu'à 75% du coût d'évaluation d'une substance chimique.

Qu'appelle-t-on « méthodes alternatives » ?

Les méthodes « alternatives », terminologie inventée en 1978 par le physiologiste David Smyth, regroupent les méthodes permettant de satisfaire un ou plusieurs principes des « 3R ».

Les méthodes de substitution : *ex vivo* (prélèvements de tissus d'animaux vivants) ; *in vitro* (modèles cellulaires) ; *in silico* (modèles biomathématiques utilisant des bases de données issues d'expérimentation *in vivo* ou *in vitro*) ; chimie analytique ; regroupement de substances et méthodes de références croisées (lorsque certaines substances ont des points communs suffisants avec des substances déjà connues) ; cellules souches ; organes bio-artificiels ; cultures organotypiques (modèles construits à partir de fragments de tissus ou d'organes).

Les méthodes de réduction : méthodes statistiques (par lesquels on obtient plus d'informations à partir d'un seul protocole) ; utilisation d'espèces pour lesquelles les connaissances scientifiques établissent qu'elles sont moins sensibles à la contrainte que d'autres ; contrôle de la variabilité de la réponse (par les paramètres environnementaux et le statut sanitaire et génétique des animaux) ; « omics » (techniques d'analyse explorant au niveau moléculaire la synthèse des protéines) ; modèles animaux transgéniques ; stratégies de tests intégrés (ITS – stratégie consistant en des séries de tests, effectués en commençant par des tests substitutifs, avec une évaluation et une prise de décision « arrêt » ou « poursuite » à chaque étape du processus).

Les méthodes de raffinement : diminution de la douleur (examen clinique) ; imagerie du petit animal *in vivo* (IRM, ultrasons, bioluminescence, scintigraphie, tomographie) ; télémétrie (enregistrement de paramètres physiologiques en continu).

L'enjeu : articuler le développement des méthodes en recherche et les usages industriels et réglementaires

Les méthodes alternatives constituent un outil de travail important pour la recherche : en toxicologie-écotoxicologie, comme en biologie ou dans la recherche médicale, il est pertinent de recourir à des modèles cellulaires ou mathématiques afin de mieux comprendre les mécanismes d'effets des substances sur les organismes. Le développement de ces méthodes s'inscrit naturellement dans les avancées des sciences du vivant, mais sans que l'objectif des développeurs soit forcément d'améliorer les prédictions sur les dangers des substances réglementées.

Les méthodes alternatives pour la recherche nécessitent une validation scientifique, éventuellement une normalisation ou une certification, mais pas obligatoirement une validation au sens réglementaire. La validation réglementaire est, elle, contraignante dans la mesure où une méthode recevable doit apporter, outre ce qui est demandé pour reconnaître scientifiquement une méthode (preuve de sa pertinence, de sa capacité à détecter les effets observés sur l'homme et l'animal), les preuves qu'elle est applicable de façon fiable et répétable en dehors de laboratoires de recherche.

Dans un contexte où l'expertise nationale en toxicologie-écotoxicologie a été identifiée comme insuffisante et mal organisée⁴, une enquête du GIS « méthodes alternatives »⁵ a souligné une perception confuse des réglementations par les chercheurs et un transfert technologique de la recherche fondamentale vers la recherche appliquée peu efficace.

Certains domaines, pour lesquels l'incitation au développement de méthodes alternatives est faible, sont « orphelins » : c'est le cas pour la reprotoxicité. Aujourd'hui, sur les 15 méthodes substitutives (majoritairement *in vitro*) validées réglementairement pour la toxicité, un seul test concerne l'évaluation du potentiel reprotoxique (contre 3 pour la corrosion, 3 pour l'irritation et 6 pour les effets mutagènes et génotoxiques).

⁴ Voir le rapport des travaux menés en 2008 et 2009 dans le cadre de l'expertise collective du CNRS et de l'atelier de réflexion prospective de l'ANR (coordonné par l'INERIS et l'APESA) sur REACh *Comment les chercheurs peuvent-ils répondre aux enjeux de REACh ?*

⁵ Voir *Etat des lieux des méthodes alternatives dans le domaine de l'expérimentation animale en France*, rapport à Madame la Ministre de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, 30 mars 2010.

L'INERIS, membre fondateur du GIS « méthodes alternatives »

En 2008, l'INERIS a participé à la création de la plateforme française pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale. Ce Groupement d'Intérêt Scientifique a pour but d'identifier et de promouvoir ce type de méthodes dans le développement, l'évaluation et le contrôle des produits de santé et des substances chimiques. Il réunit le Ministère de la Recherche, l'AFSSAPS, l'INERIS, l'Anses, l'Inserm, le CNRS, l'UIC (Union des Industries Chimiques), la FEBEA (Fédération des Entreprises de la beauté), le LEEM (les entreprises du médicament), le CEA, l'INRA, l'OPAL (Recherche expérimentale et protection de l'animal de laboratoire), la LFDA (La fondation droit animal éthique et science), la SPTC (Société de pharmaco-toxicologie cellulaire).

Comment développer les méthodes alternatives ?

Les enjeux de la stratégie de développement de méthodes alternatives vont au-delà de ceux communément admis. L'enjeu pour les industriels et pour la société civile devient prépondérant, alors qu'il n'était pas jusqu'alors objet de préoccupation. En témoignent les quatre présupposés les plus couramment rencontrés sur ces méthodes :

« Les méthodes alternatives sont des outils pour la toxicologie et l'écotoxicologie ». L'usage de l'expérimentation animale (et donc le champ d'application des méthodes alternatives) ne concerne en réalité que très marginalement les démonstrations de toxicologie, qui représentent moins de 10% des usages. Le contrôle qualité (alimentation, vaccins), la recherche et développement en pharmacologie, la recherche fondamentale sur la physiologie et la pathologie humaine et animale regroupent en fait l'essentiel des applications.

« Ces méthodes doivent définir des essais ou calculs se substituant pièce à pièce aux essais sur animaux ». La connaissance réelle d'une propriété toxique repose sur une connaissance globale des mécanismes d'action. Les essais sur animaux fournissent des critères standardisés et des éléments de preuve, dont la capacité prédictive est limitée. Le remplacement « pièce à pièce » peut au mieux figer la toxicologie prédictive à son niveau actuel. Dans cette logique, les efforts visent à reproduire les résultats des tests *in vivo* actuels (dont les protocoles ont 10 ou 20 ans) : on obtiendrait ainsi vers 2020 une valeur prédictive égale à celle des années 90. Une autre combinaison d'éléments de preuve peut ouvrir la voie à une meilleure prédictivité.

« Ces méthodes sont destinées à être utilisées dans des processus réglementaires ». Les besoins en prédiction ne sont pas uniquement réglementaires. En particulier, ils sont essentiels lors des phases de développement de molécules, dès la preuve du concept, comme c'est le cas dans les secteurs pharmaceutiques. Les méthodes alternatives fournissent aux industriels une capacité de criblage ; dès le développement de produits, elles sont pertinentes pour la surveillance directe du milieu.

« Pour être utilisées dans un dossier réglementaire, ces méthodes doivent avoir été validées par les instances réglementaires ». Le règlement REACH, par exemple, permet de faire appel à des méthodes « reconnues » à côté des méthodes « validées »⁶. En dehors des dossiers réglementaires, le besoin d'outils validés, qualifiés, reconnus est général. Lors de la preuve du concept, l'industriel doit s'appuyer sur une méthode solide. Même dans la recherche, une publication n'est éligible que lorsqu'elle utilise une méthode *a minima* reconnue par les pairs.

Le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale doit donc viser l'ensemble des usages ; aboutir à des méthodes qui, combinées les unes avec les autres, permettent d'améliorer le pouvoir prédictif de la toxicologie ; être le fruit de partenariats recherche amont/application avale et acteurs publics/privés ; être soumis à un processus de validation incluant l'examen par les pairs, la normalisation et la certification volontaire, et aboutissant éventuellement à une validation réglementaire. Industriels et autres parties prenantes doivent avoir confiance dans les outils utilisés, et développeurs de logiciels ou de kits d'essai doivent voir la qualité de leurs outils reconnue. C'est là que l'INERIS propose un savoir faire spécifique, s'inspirant de la normalisation et de la certification volontaire.

⁶ C'est le terme utilisé dans REACH pour formaliser le fait que des méthodes non validées par des instances comme l'OCDE, mais dont la valeur scientifique est reconnue, sont recevables dans les démonstrations.

Deux méthodes de criblage *in vitro* et *in vivo* pour l'évaluation des perturbateurs endocriniens, validées par les pairs

Les chercheurs de l'INERIS travaillent depuis plusieurs années à identifier et comprendre les effets des perturbateurs endocriniens (PE) dans l'environnement. Ils se sont intéressés en priorité aux poissons, qui apparaissent comme des organismes cibles particulièrement sensibles à une exposition à ce type de polluants. Dans leurs recherches, les équipes de l'Institut s'appuient sur une démarche intégrant plusieurs niveaux du vivant : moléculaire, cellulaire, tissulaire.

Une méthode de substitution : des lignées cellulaires de poisson

Les méthodes *in vitro* forment la majorité des méthodes de remplacement développées comme alternatives en expérimentation animale. Par ailleurs, leur rapport coût/performance (automatisation, faible coût, rapidité) en fait un outil particulièrement adapté au criblage d'un grand nombre de molécules chimiques, afin d'obtenir des informations sur leur toxicité et éco-toxicité. Ce type de méthode est fondé sur les cultures de cellules, en particulier des cellules humaines (lignées cellulaires ou cellules isolées à partir d'organes ou de tissus ; co-cultures et modèles de tissus reconstruits à partir de types cellulaires différents).

Si l'approche *in vitro* ne peut remplacer l'organisme entier, compte tenu de l'isolement des cellules étudiées de leur contexte physiologique, elle est particulièrement utile, comme méthode complémentaire à d'autres types de tests, pour identifier un mécanisme de toxicité relié à un récepteur cible.

En écotoxicologie, le défi à relever est de développer des tests sensibles et spécifiques alors que l'environnement est pollué par une grande diversité de molécules chimiques, et que les substances « PE » ont des mécanismes d'action nombreux et multiples. La validation de tests de criblage adaptés à des espèces non mammifères est un enjeu pour évaluer les dangers des PE pour les espèces aquatiques.

On observe par exemple des différences d'affinités, vis-à-vis de certaines substances, au niveau des récepteurs des œstrogènes, selon que l'on a recours à des cellules humaines ou ichthyennes (compte tenu du contexte cellulaire différent et de récepteurs de sensibilité différente). Si de manière générale les modèles cellulaires de poisson sont moins sensibles aux œstrogènes que les cellules humaines, certaines molécules chimiques présentent un potentiel œstrogénique⁷ plus important chez le poisson que chez l'homme.

Les chercheurs de l'Institut ont ainsi montré que les dérivés de benzophénone, une molécule chimique couramment utilisée comme filtre anti-UV dans l'industrie et la cosmétique, ont plus d'affinités avec les récepteurs des œstrogènes de truite arc-en-ciel qu'avec les récepteurs humains (comparativement à l'oestradiol).

L'INERIS étudie, sur des cellules de poisson, les spécificités de réponse des récepteurs hormonaux (récepteur des œstrogènes) ou récepteurs xénobiotiques (récepteur de la dioxine, récepteur PXR – cible, par exemple, des molécules médicamenteuses) à des polluants aquatiques. Les experts de l'Institut ont mis au point une lignée cellulaire exprimant de manière stable le récepteur des œstrogènes (récepteur ER) de truite arc-en-ciel couplé à un gène rapporteur qui code une enzyme, la luciférase, dans les cellules hépatiques (PLHC-1) dérivées du vairon.

Cette nouvelle lignée (PELN-rtER) a été caractérisée vis-à-vis d'un panel de molécules xéno-œstrogènes et son efficacité comparée avec succès à d'autres modèles. Elle permet d'évaluer l'effet d'une substance au moyen de la luciférase qui émet une quantité variable de lumière, mesurable avec un luminomètre, en présence d'une substance qui perturbe le système endocrinien.

⁷ Le potentiel œstrogénique (REP) est déterminé relativement à l'action de l'oestradiol, considérée comme hormone de référence.

Une méthode de réduction/raffinement : le projet NEMO

Les modèles animaux transgéniques constituent une méthode de réduction de l'expérimentation animale. Ils permettent d'étudier de manière précise certains mécanismes de toxicité et de réduire ainsi le nombre d'animaux non-transgéniques utilisés pour une même expérimentation. Un animal transgénique est un animal dont un gène précis a été modifié afin d'examiner le rôle de la protéine que ce gène code.

Le programme de recherche NEMO a pour objectif de mettre en place de nouveaux tests de criblage *in vitro* et *in vivo* pour étudier les effets des PE au niveau moléculaire, cellulaire et systémique chez une espèce modèle, le poisson zèbre, recommandée par l'OCDE pour l'évaluation des substances chimiques. Le poisson zèbre est une espèce de petite taille, au développement embryonnaire rapide, avec un cycle de vie dont les stades de développement sont bien maîtrisés et dont le génome est bien caractérisé.

En partenariat avec le CNRS, l'Inserm et l'INRA, parties prenantes du projet NEMO, l'Institut a développé un test *in vivo* de criblage des xéno-œstrogènes. Ce test se fonde sur les recherches menées à l'INERIS pour mieux comprendre les PE, axées sur la caractérisation du potentiel PE des substances chimiques et leurs modes d'actions spécifiques. Les experts de l'Institut étudient chez le poisson zèbre l'expression de gènes régulés par le système hormonal, et donc cibles des PE, au niveau du cerveau (aromatase), du foie (vitellogénine) et des gonades (enzymes de la stéroïdogénèse). L'aromatase, enzyme clé de la stéroïdogénèse, est notamment responsable de la synthèse des œstrogènes dans l'organisme.

Un modèle de poisson zèbre transgénique, mis au point par l'équipe du Pr Chung de l'Université de Taïwan, a été utilisé pour développer ce test. Le principe du test est le suivant : le modèle transgénique exprime une protéine fluorescente, la GFP (Green Fluorescent Protein), placée sous le contrôle d'un gène codant l'aromatase cérébrale (*cyp19a1b*). Les substances chimiques « œstrogènes mimétiques », parce qu'elles agissent sur l'expression de l'aromatase, vont induire l'expression de la GFP après une exposition courte chez des embryons de 5 jours. L'action des xéno-œstrogènes sur la GFP est « dose-dépendante », c'est-à-dire déterminée par le niveau de concentration.

Pour une molécule xéno-œstrogène comme l'éthynyl-oestradiol, l'Institut a constaté qu'un effet intervient effectivement dans le cerveau du poisson à un stade de développement embryonnaire. Par ailleurs, la GFP est induite par des concentrations très faibles de cette molécule, ce qui démontre la très grande sensibilité du test pour évaluer les substances chimiques « œstrogènes mimétiques ».

Une thèse en cours à l'Institut travaille en parallèle sur des stratégies *in vitro*, en développant des lignées cellulaires de poisson zèbre qui expriment les différentes formes des récepteurs des œstrogènes identifiés chez cette espèce. Ces lignées doivent permettre d'évaluer les effets de diverses substances chimiques chez ce poisson.

Les méthodes de prédiction *in silico* :

Deux cas concrets d'application aux HAP et à l'ifosfamide

L'INERIS travaille sur les méthodes *in silico* dans une optique de meilleure compréhension de l'action des polluants sur l'organisme humain et l'environnement. La bioinformatique est en effet un outil de prédiction utile pour étudier l'effet toxique ou écotoxique d'une substance. Grâce à ces travaux, les chercheurs de l'Institut ont pu évaluer la pertinence de certains modèles pour prédire correctement l'impact de polluants ou de molécules médicamenteuses sur la santé.

Les méthodes *in silico* désignent les modèles biomathématiques utilisant des bases de données issues des expérimentations *in vitro* et *in vivo*. La bioinformatique permet de disposer de modèles descriptifs du vivant à différentes échelles, de l'organisme entier à la cellule. Pour la toxicité d'une substance chimique, l'approche numérique peut rendre compte des mécanismes biologiques complexes impliqués et des effets (observés dans le cadre d'une relation dose absorbée / réponse de l'organisme). L'efficacité des modèles biomathématiques comme méthodes de substitution repose sur la richesse, la qualité et la pertinence des données sur lesquelles ils se fondent ; mais certaines méthodes couplées (QSAR/PBPK par exemple)⁸ pourraient fournir une prédiction de qualité équivalente à l'expérimentation *in vivo*.

Les équipes de l'Institut étudient en particulier les modèles pharmacocinétiques (PBPK). Ces modèles toxicocinétiques décrivent l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination des substances chimiques dans l'organisme. Ils intègrent des paramètres physiologiques (flux sanguins, volumes d'organes...) et biochimiques (métabolisme, échanges système sanguin/organes). Ce type de modèle de biologie systémique est un outil précieux pour faire le lien entre les informations obtenues à l'échelle moléculaire et cellulaire et la dynamique du composé chimique dans l'organisme entier. L'enjeu est d'autant plus important que l'extrapolation de l'homme à l'animal ne produit pas toujours des résultats vérifiés dans la réalité. La dynamique de concentration dans l'organisme ou les effets sur un organe cible ne sont pas toujours les mêmes pour le modèle animal et l'être humain.

Les modèles PBPK comme outil de prédiction des effets des HAP

En collaboration avec des équipes de l'Inserm à Rennes, l'INERIS a travaillé sur l'expression de plusieurs gènes dans des macrophages exposés au benzo[a]pyrène (B[a]P), hydrocarbure aromatique polycyclique classé cancérigène. Le modèle PBPK développé pour le B[a]P a servi à mettre en relation les données obtenues *in vitro* sur des cellules et des informations collectées *in vivo* sur des macrophages pulmonaires de rat.

Au cours du travail de calibration du modèle, les équipes de l'Institut ont mis en évidence une accumulation élevée de B[a]P dans les graisses, le foie et surtout les poumons. Cela indique que les modèles actuellement utilisés pour l'évaluation du risque lié aux HAPs sous-estiment largement la concentration dans le foie et les poumons. Les modèles existants comportent des lacunes sur la toxicité pulmonaire, car ils ne prennent pas en compte l'exposition par inhalation et ne décrivent pas de manière satisfaisante le comportement du B[a]P dans les poumons. Le modèle de l'INERIS est calibré à partir de données d'exposition par instillation intra-trachéale et par voie intraveineuse. Par ailleurs, il tient compte de la cinétique des métabolites dans l'organisme vivant.

La suite de l'étude a montré que pour deux gènes cibles du B[a]P (NCF1 et IL-1 β), la prédiction du modèle PBPK calibré, une fois combinée aux données obtenues *in vitro* sur la relation « dose d'exposition-réponse de l'organisme », correspondait de manière satisfaisante aux données collectées *in vivo* sur des rats exposés au B[a]P à 3mg/kg. L'étude a ainsi conclu que ces deux gènes sont utilisables comme marqueurs d'exposition au B[a]P. La recherche se poursuit aujourd'hui pour évaluer si ces marqueurs sont aussi pertinents pour des mélanges de HAP et s'ils peuvent être révélateurs à long terme d'effets cancérigènes (surexpression de ces gènes lors de l'apparition de cancer).

⁸ QSAR : Quantitative Structure-Activity Relationship. PBPK : Physiologically Based Pharmaco-Kinetic.

Les modèles PBPK comme outil de prédiction des effets de l'ifosfamide

Les molécules présentant une cinétique particulière (accumulation et relargage lent dans les organes par exemple) sont très difficiles à modéliser. Le métabolisme de manière générale est un des processus les plus complexes à prédire, et ses mécanismes nécessitent de développer de nouvelles approches *in silico*. Les données pharmacocinétiques classiques ne suffisent en effet pas à caractériser correctement les phénomènes liés au métabolisme.

L'INERIS, en collaboration avec l'Inserm, a ainsi développé un modèle prédictif pour la dosimétrie de l'ifosfamide, une molécule thérapeutique. Un tel modèle est utilisable par les cliniciens pour, en fonction du type de patient, définir le meilleur traitement (dans lequel l'effet thérapeutique est à son maximum) et pour réduire autant que possible les effets secondaires.

Un autre intérêt de ce travail réside dans la méthodologie employée pour calibrer le modèle, parce qu'elle est applicable aux molécules environnementales. Les approches intégrées, qui combinent plusieurs méthodes alternatives, sont en effet très difficiles à mettre au point dans le cadre de l'évaluation des substances chimiques. L'approche intégrée qui a permis de calibrer le modèle de l'ifosfamide pourrait être utilisée pour mieux prendre en compte la variabilité entre individus lorsqu'il s'agit d'étudier l'accumulation d'une ou plusieurs substances chimiques dans l'organisme.

L'ifosfamide (IFO), développée dans les années 60, est une molécule thérapeutique utilisée pour le traitement des tumeurs au stade avancé. Cet anti-cancéreux nécessite d'être métabolisé pour libérer l'effet thérapeutique ; il est métabolisé principalement au niveau du foie et éliminé par voie urinaire. Or certaines études sur la pharmacocinétique de l'IFO et de ses métabolites ont suggéré la capacité de la molécule à déclencher elle-même son processus de métabolisation, par un mécanisme encore mal identifié. Ces études ont également mis en évidence une très grande variabilité de ce phénomène d'« auto-induction » entre les individus (moment de déclenchement du phénomène dans la période de traitement, voire absence de déclenchement chez certains patients). D'où la complexité à doser le traitement sur le nombre de jours de prescriptions, selon les individus traités.

Pour réduire les incertitudes affectant les paramètres métaboliques, les chercheurs de l'Institut ont développé un modèle PBPK pour décrire la pharmacocinétique de l'IFO chez l'adulte et l'enfant. Il a été calibré grâce à une approche intégrée QSAR⁹ / tests *in vitro* sur cellules hépatiques / données préexistantes *in vivo*. Le modèle a été développé et calibré sans aucun recours à l'expérimentation *in vivo*. Il se fonde sur trois postulats : seules les deux voies majeures d'élimination sont à considérer (biotransformation hépatique et excrétion urinaire) ; seule l'action de l'enzyme CYP3A4 sur ces deux voies métaboliques est prise en compte ; le mécanisme d'auto-induction du métabolisme hépatique de l'IFO est la conséquence de son action directe sur les enzymes CYP3A4 (par induction de leur synthèse).

La validation du modèle, calibré sur la base de l'infusion en continu de l'IFO administrée à des patients adultes sur 72h, a été effectuée en faisant varier deux paramètres : la posologie et la classe d'âge. La posologie a été modifiée pour des patients adultes recevant une dose fractionnée toutes les 24h pendant cinq jours de traitement. Par ailleurs, le modèle a été appliqué à des patients pédiatriques (2, 4, 10 et 19 ans), à qui on a administré l'IFO en infusion continue pendant 72h ou en dose fractionnée toutes les 24h sur trois jours. Le modèle a ainsi prédit correctement la cinétique de l'ifosfamide dans le plasma pour les deux posologies et a confirmé la cinétique spécifique de l'IFO pour chaque classe d'âge.

⁹ Les QSARs sont des modèles de relation entre la structure chimique d'une molécule et son activité biologique. Cette méthode statistique prédit les effets biologiques d'une variation de la structure moléculaire provoquée par une substance toxique, en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques.

Les travaux sur les méthodes alternatives à l'INERIS

La toxicologie et l'écotoxicologie prédictive sont des priorités stratégiques de l'INERIS, qui dispose depuis 2006 d'un comité d'éthique sur la question de l'expérimentation animale. Et les méthodes alternatives y occupent une place considérable. L'Institut est également membre fondateur de la plateforme nationale pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale.

Les axes de recherche de l'Institut

1/ Le développement et la validation de modèles *in vitro*

- pour l'évaluation du potentiel perturbateur endocrinien des substances chimiques : évaluation du danger de polluants organiques environnementaux (approche de criblage) ; évaluation des effets sur la reproduction chez le poisson (approche intégrée *in vitro/in vivo*) ; identification de substances toxiques dans l'environnement (couplage *in vitro*/fractionnement physico-chimique/analyse chimique).
- pour l'évaluation de la toxicité générale et du passage transmembranaire des substances chimiques (barrières alvéolo-capillaire au niveau du poumon, hémato-encéphalique au niveau du cerveau, hémato-testiculaire ou hémato-ovarienne au niveau des gonades et hémato-placentaire entre la mère et l'embryon ou le fœtus).

2/ La modélisation pour évaluer la dangerosité des substances grâce à des méthodes informatiques (modèles QSARs, PBPK). Les compétences de l'INERIS sont sollicitées pour évaluer des outils dans le cadre de l'OCDE (ToolBox) et du règlement REACH (groupe de travail sur les « non testing methods »), en particulier sur les modèles QSARs, méthode statistique capable de prédire les effets biologiques d'une variation de la structure moléculaire provoquée par un produit toxique, en fonction de ses propriétés physico-chimiques. Ces axes de recherche peuvent donner lieu à terme à des logiques « substitutives » pures, mais ils s'inscrivent aussi dans les Stratégies de Tests Intégrés, permettant de réduire le nombre d'essais en sélectionnant les séries de tests qui optimisent le gain d'information toxicologique au moindre coût expérimental. Le programme ANR CANTO, auquel participe l'Institut, pilote ainsi l'acquisition d'information en optimisant le recours combiné aux tests *in vitro*, à la modélisation et aux essais sur animaux.

3/ Le développement de tests sur embryon et larve de poisson pour évaluer le potentiel perturbateur endocrinien des molécules organiques. Cette action vise à proposer des tests rapides et sensibles pour le criblage du potentiel PE des substances chimiques et s'inscrit dans la démarche d'évaluation intégrée *vitro/vivo* du risque des PE. L'INERIS participe aussi au raffinement des méthodes *in vivo*, avec la recherche des biomarqueurs qui permettent des expérimentations dont le contenu scientifique est largement amélioré.

L'INERIS coordonne deux réseaux de recherche dans le domaine des méthodes alternatives :

- L'Institut participe activement à l'animation du réseau scientifique ANTIOPES, qui regroupe des chercheurs essentiellement issus de la recherche publique (INSERM, CNRS, CEA, INRA, universités). L'objectif de ce réseau est la mise en œuvre d'un programme de travail dans le domaine de la toxicologie prédictive et la santé environnementale en réponse au règlement REACH. Ce programme prévoit de développer les méthodes alternatives comme les approches de modélisation chimique prédictive et les biomarqueurs en lien avec les développements "Omics".
- Le Pôle National Applicatif en Toxicologie et Ecotoxicologie dont l'INERIS est l'initiative, s'organise autour de l'UTC, de l'unité PERITOX de l'UPJV, de l'Institut Lasalle Beauvais et du réseau ANTIOPES. L'une des principales finalités du Pôle est le développement de méthodes alternatives opérationnelles dans le domaine du risque environnemental.

Le rôle du pôle national en toxicologie-écotoxicologie, centre de référence sur les méthodes alternatives

Quelle stratégie de développement des méthodes alternatives ?

Les méthodes alternatives en expérimentation animale doivent répondre à un certain nombre d'enjeux qui impliquent d'organiser les stratégies de développement en tenant compte des paramètres suivants :

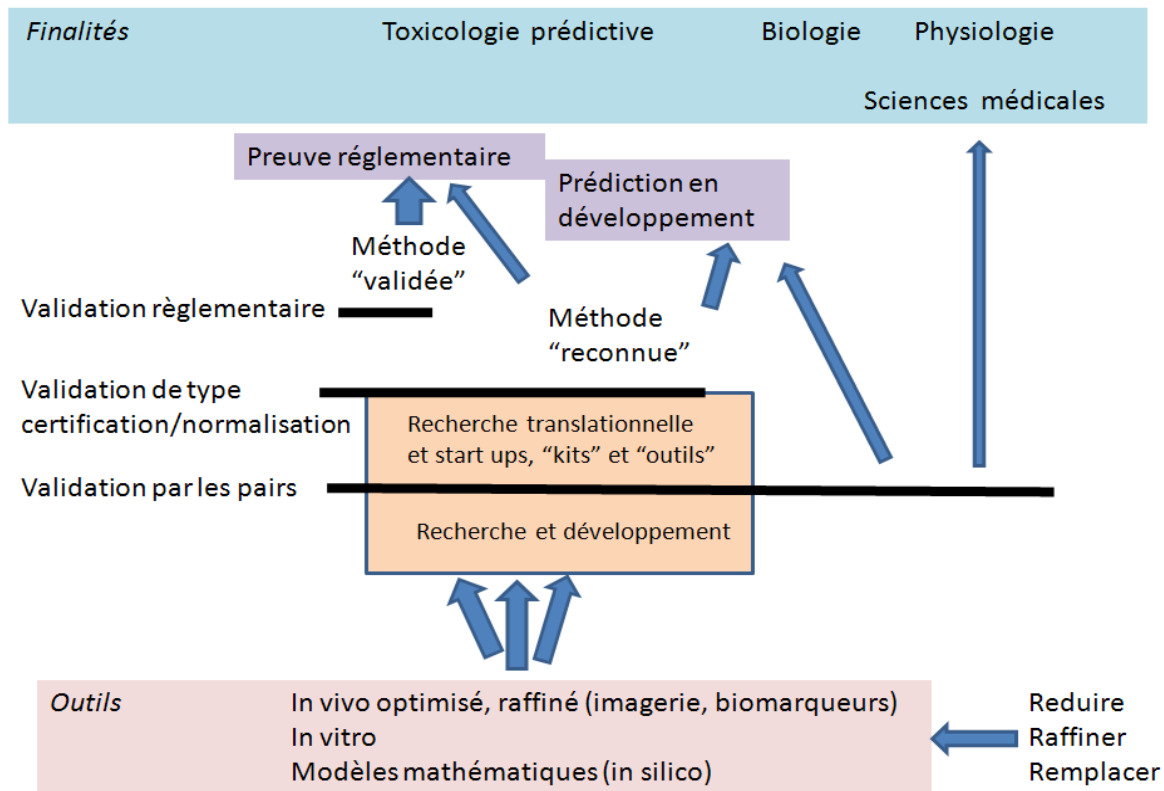
- Le développement de méthodes doit viser l'ensemble des usages pour une utilisation en biologie fondamentale, en R&D biomédicale, en production et contrôle qualité, en toxicologie et écotoxicologie prédictive et en enseignement. Ces méthodes relèvent des approches *in vitro* traditionnelles et améliorées par des techniques d'analyse à haut flux, des organes artificiels (co-cultures de cellules, modèles de barrières), organes bio artificiels (cultures de systèmes cellulaires différents des systèmes artificiels), mais aussi outils informatiques PBPK, QSARs et enfin techniques non douloureuses pour les études sur animaux avec le recours à l'imagerie non invasive et aux biomarqueurs non destructifs.
- Le recours à ces méthodes, en combinaison les unes avec les autres et en lien avec la volonté de la recherche de mieux connaître les mécanismes d'action des substances, doit permettre de faire faire un saut à la toxicologie en termes de pouvoir prédictif. La mise en réseau d'équipements performants mais de nature très diverse est ainsi une clé du succès.
- Les développements prennent place aux différentes étapes du processus de recherche scientifique, des aspects plus fondamentaux jusqu'au développement technologique, puis à la mise sur le marché avec une logique de niveau de qualité et de fiabilisation adaptée. La consolidation des validations doit partir de l'examen par les pairs et la publication, aller jusqu'à la normalisation et à la certification volontaire, et aboutir éventuellement à une certification réglementaire ou une validation par une instance réglementaire. La place relativement faible de l'utilisation en fin de processus réglementaire conduit à privilégier les logiques de certification.
- Les partenaires impliqués dans le développement vont être les acteurs de la recherche amont, de la recherche appliquée et du développement technologique. Ceux-ci peuvent ainsi appartenir au monde académique, à celui de l'entreprise traditionnelle et à celui des start-up. L'organisation des partenariats recherche amont/application avale et acteurs publics/privés est un enjeu majeur. Les « usagers » de ces méthodes relèvent de l'ensemble des secteurs concernés : ils ont des besoins décalés suivant leur position et suivant les étapes du développement de substances. Les logiques de développement et de partenariat doivent s'adapter à des besoins industriels qui sont variables selon les secteurs, et variables selon les stades d'un produit.

La nécessité d'un centre de référence sur les méthodes alternatives

La réflexion conduite par le GIS « méthodes alternatives » a défini plusieurs pistes. A côté de la structuration de la validation réglementaire qui concerne plutôt les agences gouvernementales, une recommandation porte sur la mise en place d'un centre de référence sur les méthodes alternatives.

L'INERIS, ses partenaires d'ANTIOPEs, ses partenaires du pôle national applicatif en toxicologie-écotoxicologie contribuent à l'extension et à la montée en crédibilité des méthodes, en développant et qualifiant de nouveaux outils prédictifs. Les approches relèvent de l'amélioration du *in vivo*, du *in vitro* et du *in silico*. Les développements portent sur les méthodes qui répondent aux impératifs des « 3R » (Réduction, Remplacement, Raffinement). Leur finalité est d'améliorer la capacité de prédiction des essais et de la modélisation en toxicologie, ainsi que l'investigation en biologie fondamentale et appliquée.

Ainsi les nouveaux outils développés grâce au centre ne visent pas uniquement à se substituer aux essais réglementaires en cours (ce qui serait une démarche de validation réglementaire). En effet, une approche de substitution pure aux systèmes d'essais réglementaires utilisés aujourd'hui fige la capacité de prédiction à celle de l'époque où ont été définis les protocoles d'essais sur animaux que l'on cherche à remplacer « pièce à pièce ». Or il faut dépasser les limites actuelles des capacités de prédiction des dommages potentiels des substances. De même, ces nouveaux outils fournissent aux industriels les moyens de réaliser un criblage lors du développement de produits.



Le centre doit aussi assurer que les industriels et les autres parties prenantes éventuelles puissent avoir confiance dans les outils utilisés, et que des développeurs qui fournissent des logiciels ou des kits d'essai puissent voir reconnue leur qualité. C'est là, entre la validation par les pairs dans une logique de recherche, et la validation exigée dans certaines réglementations, que se situe le travail du centre, proche de la normalisation et de la certification volontaire¹⁰. Comme pour le développement, le travail pour ce type de validation peut être assuré en partenariat avec l'industrie : étude de la reproductibilité des résultats de méthodes, confrontation aux résultats d'essais, étude de la valeur prédictive par rapport à un mécanisme de toxicité (par exemple reprotoxicité) font partie des travaux.

Au-delà, le portage des outils par des entreprises start-up est la troisième fonction que doit faciliter le centre. La mise en réseau des équipes de recherche sur ces sujets, dans un esprit pluridisciplinaire rassemblant expérimentateurs, modélisateurs et développeurs de technologies, la mise à disposition d'équipements sur les différentes approches expérimentales de la cellule à l'organisme entier, leur couplage avec une instrumentation pour des analyses chimiques et biologiques à haut flux font partie des éléments que le centre a déjà ou ambitionne de rassembler.

¹⁰ Ce niveau de validation peut même être éligible dans des systèmes réglementaires (méthodes « reconnues » de REACH).

Le cadre du centre de référence : le pôle national en toxicologie-écotoxicologie

Le pôle national applicatif en toxicologie et écotoxicologie a été lancé le 15 janvier 2009. Il reprend les orientations des PNSE I et II et s'inscrit dans le cadre des recommandations du rapport final du Comité Opérationnel sur la Recherche du Grenelle de l'environnement. Le rapport propose « *d'encourager la mise en réseau de l'ensemble des acteurs de la recherche sur les mécanismes de toxicité et d'assurer l'émergence d'un centre d'une taille critique de niveau international. Il est donc recommandé de créer un pôle national couplant la toxicologie et l'écotoxicologie et de lui donner les moyens d'atteindre une dimension internationale* ». Il précise que « *le renforcement proposé du pôle existant en sud Picardie autour de l'INERIS et de l'Université de Technologie de Compiègne contribuerait efficacement au développement de la toxicologie et de l'écotoxicologie comme recommandé dans le cadre du Grenelle* ». L'article 32 de la loi Grenelle I a repris cet engagement.

Le pôle national applicatif a pour objectif l'augmentation des connaissances pour répondre aux attentes des entreprises et des pouvoirs publics. Par ailleurs il vise à renforcer les équipes en formant les experts et chercheurs dont les organismes de recherche et les industriels ont besoin. Dans ce contexte le pôle comporte cinq composantes : l'adossement à des réseaux de partenaires scientifiques et industriels ; la définition d'axes de recherche bien identifiés et finalisés ; la contribution à l'effort national d'enseignement ; la mise en place d'équipements, nouveaux ou mis en réseau ; le transfert de technologie et l'aide à la mise en place d'équipes opérationnelles sur des objets émergents (start-up).

Le réseau de partenaires

L'INERIS a développé de longue date des liens forts avec ses partenaires académiques en Picardie. Ainsi, le pôle s'appuie sur les ressources de quatre partenaires régionaux : l'INERIS, l'Université de Technologie de Compiègne (UTC) ; l'Université de Picardie Jules Verne (UPJV) et l'Institut Polytechnique LaSalle Beauvais.

Le réseau scientifique ANTIOPES réunit près de 300 chercheurs, avec des équipes de toxicologues et écotoxicologues de 11 organismes de recherche français. ANTIOPES a vocation à développer des méthodes et des outils en toxicologie prédictive à finalité environnement santé. Le réseau rassemble aujourd'hui, en plus de l'INERIS, de l'UTC, de l'UPJV et de l'Institut LaSalle Beauvais, le CEA, le CRITT Chimie PACA, l'INRA, l'INSERM, l'Université de Provence Aix-Marseille I, l'Université Denis Diderot Paris VII, l'Université de Metz.

L'INERIS a conclu avec le CEA un accord sur l'analyse et la maîtrise des risques toxicologiques et environnementaux, notamment sur les risques associés aux nanoparticules et aux nanopoudres. L'Institut développe en partenariat des travaux en chimie analytique et en écotoxicologie. Il coordonne le consortium SQUAREF qui rassemble l'Ifremer, l'INERIS, le LNE, le BRGM et le Cemagref et appuie les autorités publiques pour définir et mettre en œuvre les programmes de surveillance des milieux aquatiques. Par ailleurs, un accord cadre a été signé avec l'Onema pour lutter contre les pollutions chimiques dans les milieux aquatiques.

Les équipements

La région Picardie et l'Etat ont soutenu, dans le cadre du Contrat de Projet Etat-Région 2007-2013, des équipements structurants pour le pôle, l'un sur la chimie proposé par l'INERIS (voie d'exposition : inhalation) et l'autre sur la biologie proposé par l'Institut Polytechnique LaSalle Beauvais (voie d'exposition : ingestion). Cette plate-forme expérimentale pour la validation et le développement de méthodes alternatives doit répondre aux besoins en bio-essais engendrés par le développement des études de toxicologie environnementale ainsi qu'aux travaux de qualification des méthodes alternatives.

Le mésocosme est un dispositif expérimental clos qui permet d'étudier les effets des polluants sur les écosystèmes, en simulant à moyenne échelle les conditions d'un milieu aquatique. Outil indispensable à l'Institut pour conduire ses études écotoxicologiques, il est constitué de douze canaux en béton, de 20 m de long, 1 m de large et 30 à 70 cm de profondeur, qui contiennent les composants d'un écosystème : sédiments, bactéries, champignons, planctons, invertébrés, poissons, etc.

Les méthodes alternatives et la mise en œuvre de REACH

Les principes du règlement REACH

Le règlement européen REACH¹¹, entré en vigueur en France le 1^{er} juin 2007, représente une évolution majeure dans le domaine des substances chimiques. Il crée une nouvelle procédure instituant l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et la restriction des substances chimiques, pour tous les producteurs et importateurs¹² de substances¹³ sur le territoire de l'Union Européenne.

- La mise en œuvre du règlement doit permettre, grâce à la procédure d'enregistrement, d'obtenir des informations sur les risques potentiels générés par plus de 30 000 substances afin d'améliorer la protection de la santé humaine et de l'environnement.
- La responsabilité de l'évaluation et de la gestion des risques est confiée non plus aux autorités administratives, mais aux industriels. REACH « repose sur le principe qu'il incombe aux fabricants, aux importateurs et aux utilisateurs en aval de veiller à fabriquer, mettre sur le marché, ou utiliser des substances qui n'ont pas d'effets nocifs pour la santé humaine ou l'environnement ».
- A terme, le règlement favorise une politique d'innovation et de substitution des substances les plus dangereuses : la procédure d'autorisation, dans les faits, correspond à une interdiction *a priori* d'utiliser une substance donnée, sauf si une demande d'autorisation est déposée pour un usage spécifique.

L'Agence Européenne des Produits Chimiques (ECHA), basée à Helsinki, est en charge de la mise en œuvre du règlement et de la gestion des quatre volets de la procédure (enregistrement, évaluation, autorisation, restriction).

Les industriels sont tenus d'évaluer les propriétés physicochimiques, toxicologiques et écotoxicologiques de leurs substances. Concernant les dangers pour la santé, le rapport de sécurité chimique doit renseigner sur : la toxicocinétique, la toxicité aiguë, l'irritation (œil, peau, voies respiratoires), la corrosivité, la sensibilisation (peau, système respiratoire), la toxicité par administration répétée, la mutagénicité, la carcinogénicité, la toxicité pour la reproduction, les effets sur la fertilité, la toxicité pour le développement. Par ailleurs, il doit contenir des données sur les dangers pour le milieu aquatique (y compris les sédiments), le milieu terrestre, le milieu atmosphérique. Dans le cadre des caractéristiques physico-chimiques, l'inflammabilité, l'explosibilité et le pouvoir oxydant doivent être évalués.

L'expérimentation animale en Europe¹⁴

En 2005, 12,1 millions d'animaux ont été utilisés en Europe (dont 2,3 en France) : plus des trois-quarts sont des rongeurs. Les animaux sont utilisés à 33% pour les études de biologie fondamentale, à 30% pour la recherche en médecine humaine et vétérinaire et à 12% pour le contrôle qualité des médicaments destinés à la santé humaine. Les études de toxicologie et d'évaluation de sécurité représentent 8% des animaux. La toxicologie a recours à plus de la moitié des animaux dans un but de contrôle qualité pour se conformer à la législation en vigueur. Par ailleurs, la moitié des études toxicologiques recourant à l'animal concernent les médicaments humains. Un peu plus des 2/5^{èmes} des animaux sont employés pour évaluer la toxicité aiguë et subaiguë.

¹¹ Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances : règlement du Parlement Européen et du Conseil n°1907/2006 du 18 décembre 2006, concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances.

¹² Le règlement REACH implique la participation active des producteurs et importateurs de substances, mais aussi des utilisateurs, qui doivent faire circuler des informations en amont et en aval sur la façon dont est utilisée la substance, les données sur la substance elle-même et transmettre les mesures appropriées de gestion des risques.

¹³ REACH s'applique aux substances chimiques en tant que telles, mais aussi lorsque ces substances sont incluses dans des préparations et, sous certaines conditions, dans des articles.

¹⁴ Dernière enquête publiée par la Commission Européenne relative à l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques : *cinquième rapport sur les statistiques concernant le nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales et d'autres fins statistiques dans l'Union Européenne*. COM (2007) 675, paru au Journal Officiel C9 du 15/01/2008.

La promotion des alternatives à l'expérimentation animale

Compte tenu du très grand nombre de substances chimiques à évaluer, le règlement REACH souligne l'importance de « promouvoir le développement des méthodes alternatives pour l'évaluation des dangers liés aux substances ». La mise en œuvre du règlement « devrait chaque fois que possible reposer sur le recours à des méthodes d'essai de remplacement adaptées à l'évaluation des dangers présentés par les substances chimiques pour la santé et pour l'environnement. Il convient d'éviter l'utilisation d'animaux en recourant à d'autres méthodes validées par la Commission ou par des organismes internationaux ou reconnues par la Commission ou par l'Agence ».

Le règlement stipule que si des essais *in vivo* sont effectués, ils doivent être conformes aux exigences réglementaires de la protection des animaux de laboratoire (directive 86/609/CEE du Conseil¹⁵) et des Bonnes Pratiques de Laboratoire (directive 2004/10/CE du Parlement). Il précise également qu'« en vue d'éviter tout double emploi, et notamment de réduire les essais sur les animaux vertébrés, les dispositions relatives à l'élaboration et à la présentation des enregistrements et des mises à jour devraient prescrire un partage d'informations lorsqu'il est demandé par un déclarant. Si les informations concernent les animaux vertébrés, le déclarant devrait être tenu de le demander ».

REACH précise que « la production d'informations par d'autres moyens donnant des résultats équivalents à ceux des essais et des méthodes d'essai prescrits » doit également être autorisée, « par exemple lorsque ces informations proviennent de modèles de relations qualitatives ou quantitatives structure-activité valables » (modélisation numérique QSAR).

Le règlement conclut que la Commission, les États membres, le secteur et les autres acteurs doivent « contribuer à la promotion de méthodes d'essai de remplacement aux niveaux international et national, y compris les méthodes assistées par ordinateur, les méthodes *in vitro*, et, le cas échéant, celles reposant sur la toxicogénomique et d'autres méthodes pertinentes ».

Afin d'éviter la répétition d'essais inutiles et limiter l'utilisation d'animaux, la procédure de REACH impose aux fabricants et importateurs de partager leurs données sur les substances au sein de Forums d'Echanges d'Informations sur les Substances (SIEF).

Les méthodes alternatives dans la Directive 2010/63/UE du Parlement et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques

La Directive régit l'expérimentation animale sur les vertébrés (et céphalopodes) sur le type d'expériences réalisées, sur les expérimentateurs autorisés, les établissements d'élevage et d'expérimentation, les catégories d'animaux utilisés, leurs conditions d'hébergement et de soins.

L'article 4 de cette Directive reprend le principe des « 3R » en précisant que « les États membres veillent, dans toute la mesure du possible, à ce que soit utilisée, au lieu d'une procédure, une méthode ou une stratégie d'expérimentation scientifiquement satisfaisante, n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants » (*replace*), que « les États membres veillent à ce que le nombre d'animaux utilisés dans un projet soit réduit au minimum sans compromettre les objectifs du projet » (*reduce*) et que « les États membres veillent au raffinement des conditions d'élevage, d'hébergement et de soins, et des méthodes utilisées dans les procédures, afin d'éliminer ou de réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse ou tout dommage durable susceptible d'être infligé aux animaux » (*refine*).

Par ailleurs, l'article 13 précise que « les États membres veillent à ce qu'une procédure ne soit pas menée si la législation de l'Union reconnaît une autre méthode ou stratégie d'expérimentation n'impliquant pas l'utilisation d'un animal vivant pour obtenir le résultat recherché. Le choix entre les procédures est guidé par le souci de sélectionner celles qui satisfont le mieux aux exigences suivantes: utiliser le moins d'animaux possible; utiliser les animaux les moins susceptibles de ressentir de la douleur, de la souffrance, de l'angoisse ou de subir des dommages durables; causer le moins possible de douleur, de souffrance, d'angoisse ou de dommages durables, et sont les plus susceptibles de fournir des résultats satisfaisants ».

¹⁵ Directive dont la révision a abouti à la Directive 2010/63/UE du Parlement et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Mise en œuvre de REACh : les principes

La première étape de la mise en œuvre de REACh a consisté en une période de pré-enregistrement des substances pouvant bénéficier d'un régime transitoire, qui s'est déroulée du 1^{er} juin au 1^{er} décembre 2008. Pour les substances nouvelles, l'enregistrement doit être fait sans délai depuis le 1^{er} juin 2008. Les substances déjà sur le marché bénéficient d'un calendrier d'enregistrement étalé : celles qui sont fabriquées ou importées en quantités supérieures ou égales à 1 000 t/an doivent être enregistrées avant le 1^{er} décembre 2010 ; les substances fabriquées ou importées en quantités supérieures ou égales à 100 t/an par an doivent l'être avant le 1^{er} juin 2013 et celles fabriquées ou importées en quantités supérieures ou égales à 1 t/an ont jusqu'au 1^{er} juin 2018 pour être enregistrées.

Dans le cadre de la loi 2008-757 du 1^{er} août 2008 sur la responsabilité environnementale, le Gouvernement français a adopté l'ordonnance n°2009-229 du 26 février 2009. Elle définit l'organisation du contrôle et les régimes de sanction en cas de non application de la réglementation REACh, modifiant le Code de l'Environnement (art. L521-17 et sqq, art L521-21 et sqq) et le Code du Travail (art. L4411-3 et sqq). Les sanctions sont principalement administratives, mais des sanctions pénales sont prévues pour réprimer les infractions graves.

La procédure d'autorisation de REACh impose par ailleurs une utilisation encadrée des substances chimiques extrêmement préoccupantes, qui doivent être inscrites dans l'annexe XIV du règlement : environ 1 500 substances seraient susceptibles d'être concernées. Il s'agit des substances classées CMR 1 et 2, des substances PBT et vPvB¹⁶ et des substances « de niveau de préoccupation équivalent, comme les perturbateurs endocriniens ». Depuis octobre 2008, l'ECHA examine des substances et propose celles qu'elle a choisies au Comité des Etats-Membres, qui donne son accord pour leur inclusion dans la « liste candidate ». La « liste candidate », définie à l'article 59.1 du règlement, identifie les substances extrêmement préoccupantes en vue de leur inscription éventuelle à plus ou moins long terme à l'annexe XIV. La « liste candidate » compte à ce jour 46 substances.

Un autre règlement européen est aujourd'hui intégré dans les procédures REACh : le règlement « Classification, Labelling, Packaging » (CLP)¹⁷, entré en vigueur le 20 janvier 2009, qui définit les règles de classification, d'emballage et d'étiquetage des produits chimiques en Europe. Ce nouveau système, qui met en œuvre les recommandations internationales du Système Général Harmonisé (SGH)¹⁸, va progressivement remplacer le système actuel. Il s'applique de façon obligatoire aux substances au 1^{er} décembre 2010 et sera étendu aux mélanges en juin 2015.

Le règlement CLP concerne toutes les entreprises qui dans l'Union Européenne fabriquent, importent ou distribuent des produits chimiques. Il comprend 10 classes de danger pour la santé humaine, dont les définitions sont différentes de celles inscrites jusqu'à présent dans la réglementation car elles tiennent compte du progrès des connaissances en toxicologie. Concernant les dangers pour l'environnement regroupés au sein d'une seule classe, les dangers à court et à long terme sont plus nettement différenciés qu'auparavant. Le règlement CLP comporte enfin 16 classes de dangers physiques contre 5 dans le système européen actuel. Ces classes de danger sont proches de celles utilisées par la réglementation sur le transport des matières dangereuses (TMD), déjà régie par un système international unifié.

¹⁶ CMR : Cancérogène, Mutagène et Reprotoxique. PBT : Persistantes, Bioaccumulables et Toxiques. vPvB : très Persistantes et très Bioaccumulables.

¹⁷ Règlement CE n°1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges. L'application de ce règlement abrogera totalement en 2015 (sauf dispositions particulières) le système existant encadré par la directive 67/548/CEE modifiée relative à la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances dangereuses et la directive 1999/45/CE modifiée relative à la classification, l'étiquetage et l'emballage des préparations dangereuses.

¹⁸ Le Système Général Harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques est un ensemble de recommandations élaborées au niveau international qui harmonisent : les critères de classification permettant d'identifier les dangers des produits chimiques ; les éléments de communication sur ces dangers (contenu de l'étiquette et de la fiche de données de sécurité). Ces recommandations élaborées à partir des systèmes de classification existants visent à créer un système unique à l'échelle mondiale.

L'INERIS et REACH

L'INERIS, héritier de l'expertise de l'Institut de Recherche en Chimie Appliquée (IRCHA), est un spécialiste des risques sanitaires et environnementaux liés aux activités économiques et industrielles, en particulier les risques de pollution par les substances chimiques. L'INERIS dispose d'équipes d'experts et de chercheurs qui travaillent sur l'évaluation de la toxicité et de l'écotoxicité des substances, sur la caractérisation et la mesure des polluants chimiques (dans l'air ambiant et intérieur, les milieux aquatiques et les sols), sur l'évaluation de leur impact sanitaire et des risques d'exposition des populations à ces polluants.

L'implication de l'INERIS dans la mise en œuvre du règlement REACH¹⁹

En 2005, l'Institut crée en partenariat avec l'INRS le Bureau d'Evaluation des Risques des Produits et agents Chimiques (BERPC). Cette structure avait pour objectif de créer, en France, un pôle d'expertise scientifique des dangers et des risques des agents chimiques pour l'homme et l'environnement.

Le BERPC a été intégré le 1^{er} juillet 2009 au sein de l'Afsset, afin de faire émerger un acteur unique de l'expertise réglementaire des dangers et des risques des substances chimiques²⁰. A cette occasion, ses activités de « Service National d'Assistance sur les aspects réglementaires et techniques du règlement REACH » mis à disposition des industriels ont été incluses dans les missions de l'INERIS.

Outre le helpdesk REACH, l'INERIS accompagne les industriels dans la mise en œuvre de REACH à différents niveaux : aide au développement de technologies propres et durables au moment de la production des substances ; développement de connaissances sur les substances et produits pour la constitution des dossiers d'enregistrement (R&D sur les méthodes d'évaluation de risques *in vivo*, *in vitro* et *in silico* ; réalisation d'essais de toxicité et écotoxicité ; expertise sur les valeurs repères de toxicité et d'écotoxicité).

Les experts de l'INERIS participent au développement d'une expertise française reconnue au niveau international, en intervenant auprès de l'ECHA, des industriels européens et des structures mixtes publiques-privés. L'Institut prend ainsi part au comité d'analyse socioéconomique et au comité d'évaluation des risques de l'Agence européenne.

Les helpdesks REACH et CLP

Les états membres de l'Union Européenne ont la mission d'assurer, sur leur territoire, un service national d'assistance sur les obligations des industriels vis-à-vis du règlement REACH et du règlement CLP (Classification, Labelling and Packaging). Placée notamment sous la responsabilité du Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement, cette assistance a été confiée à l'expertise de l'INERIS.

Les helpdesks, constitués d'une équipe pluridisciplinaire (physico-chimie, toxicologie, écotoxicologie), ont pour mission de faciliter l'accès des entreprises à un niveau suffisant d'information sur les différents aspects des règlements, pour leur permettre de répondre à leurs obligations réglementaires.

¹⁹ Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances : règlement du Parlement Européen et du Conseil n°1907/2006 du 18 décembre 2006, concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances.

²⁰ L'Afsset est devenue l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation de l'Environnement et du travail (Anses) au 1^{er} juillet 2010 suite à sa fusion avec l'Afssa. L'Anses aura la charge de réaliser la contre expertise des risques relative aux dossiers déposés par les industriels.

Ils apportent des réponses aux industriels :

- par le biais des sites Internet www.reach-info.fr et www.clp-info.fr ;
- via le 00820 20 18 16²¹ de 9h à 12h du lundi au vendredi (information de premier niveau) ;
- par voie postale.

Les helpdesks proposent des documents et supports d'information accessibles à tous ; diffusent l'actualité réglementaire (Communauté Européenne, Agence Européenne des Produits Chimiques, ministères...) et annoncent les manifestations au sein des régions ; mettent à jour en continu les informations disponibles sur les sites Internet.

Les services nationaux d'assistance réglementaire sont un service gratuit de l'Etat mis à disposition de l'industrie, à distinguer des actions de conseil et de soutien qui relèvent du marché privé. Cette assistance est en priorité destinée aux PME. Les Helpdesks assurent la diffusion la plus large possible de l'information et s'appuient notamment sur les relais que sont les organisations professionnelles et les Chambres de Commerce et d'Industrie, qui jouent un rôle de premier plan pour guider les professionnels dans leurs démarches réglementaires.

²¹ Numéro Indigo (0,09 € TTC/mn).

L'INERIS en bref

20 ans d'existence et 60 ans d'expérience : un expert héritier d'un savoir-faire issu des secteurs des mines, de l'énergie et de la chimie.

L'INERIS, établissement public à caractère industriel et commercial placé sous la tutelle du ministère chargé de l'environnement, a été créé en 1990. Il est né d'une restructuration du Centre de Recherche des Charbonnages de France (CERCHAR) et de l'Institut de Recherche Chimique Appliquée (IRCHA), et bénéficie d'un héritage de plus de 60 ans de recherche et d'expertise reconnues.

- Un effectif total de 573 personnes dont 333 ingénieurs et chercheurs.
- 40 spécialistes des géosciences basés à Nancy dans le cadre d'activités de recherche et d'expertise sur les risques liés à l'Après-Mine.
- Un siège dans l'Oise, à Verneuil-en-Halatte : 50 hectares, dont 25 utilisés pour des plates-formes d'essais, 25 000 m² de laboratoires.

Domaines de compétence : <ul style="list-style-type: none">▪ Risques accidentels : sites Seveso, TMD, malveillance, dispositifs technologiques de sécurité, GHS▪ Risques chroniques : pollution de l'eau et de l'air, sols pollués, substances et produits chimiques, CEM, REACH, environnement-santé▪ Sols et sous-sols : cavités, après-mine, émanations de gaz, filière CCS▪ Certification, formation, outils d'aide à la gestion des risques	Activité (quelques chiffres) : <ul style="list-style-type: none">▪ Recettes : 69 M€ en 2010▪ Recherche amont et partenariale : 21 %▪ Appui aux pouvoirs publics : 62 %▪ Expertise réglementaire : 17 %▪ Expertise conseil ▪ 3 M€ de CA à l'export en particulier en Europe et en Afrique méditerranéenne.
--	---

Une déontologie et une gouvernance reconnues de longue date

- Des règles de déontologie encadrent l'indépendance des avis de l'INERIS. Un comité indépendant suit l'application de ces règles et rend compte chaque année depuis 2001 directement au Conseil d'Administration.
- Un conseil scientifique et des commissions scientifiques évaluent les projets de recherche ainsi que les équipes depuis 1997. Un comité d'éthique suit les pratiques de recours et d'essais en animalerie.
- L'INERIS est certifié ISO 9001 : 2000 depuis 2001 ; plusieurs laboratoires disposent d'agrément COFRAC ou BPL.

Acteur de l'Europe de la recherche, l'INERIS s'intègre à l'Europe de l'expertise

- L'INERIS assure le secrétariat de la plate-forme European Technology Platform on Industrial Safety qui rassemble plus de 150 partenaires publics ou privés. Son succès a conduit la DG Recherche à confier à ETPIS des thématiques telles que les nanotechnologies.
- L'Institut est engagé dans plusieurs partenariats pérennes issus de projets européens : le GEIE EU-Vri avec la fondation allemande Steinbeis (plus de 100 M€ en 2006 en recherche partenariale), L-Surf Services (partenaires suédois, allemands et suisses)...

Une démarche de développement durable

Conformément au Contrat d'objectifs le liant avec son autorité de tutelle, l'INERIS a engagé une démarche de développement durable qui repose sur une recherche d'économies et de pratiques éthiques : un accord d'entreprise en faveur du travail des handicapés a par exemple été signé en septembre 2007 et un audit énergétique a été réalisé afin de veiller à une utilisation optimale des énergies.