

COMITE NATIONAL DE REFLEXION ETHIQUE SUR L'EXPERIMENTATION ANIMALE

Le Président

28 juin 2017

Recommandation sur la production d'anticorps par liquide d'ascite chez la souris

Le Comité national de réflexion éthique en expérimentation animale (CNREEA) a été saisi en juin 2014 par le ministère chargé de l'agriculture sur la question de la production d'anticorps par ascite chez le rongeur.

La directive 2010/63/UE représente dans son Considérant 10 « une étape importante vers la réalisation de l'objectif final que constitue le remplacement total des procédures appliquées à des animaux vivants à des fins scientifiques et éducatives, dès que ce sera possible sur un plan scientifique. À cette fin, elle cherche à faciliter et à promouvoir les progrès dans la mise au point d'approches alternatives. Elle vise également à assurer un niveau élevé de protection des animaux qui doivent encore être utilisés dans des procédures. »

Il apparaît que les approches alternatives à l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques doivent être préférées aux procédures expérimentales si elles permettent d'atteindre l'objectif scientifique. Dans le cas de la production d'anticorps, il s'agit de privilégier la production *in vitro* par culture des hybridomes par rapport à la production *in vivo* par liquide d'ascite, dans un contexte où les outils anticorps obtenus doivent être des plus performants.

Etant donné que :

- les anticorps sont des outils puissants et de qualité à la fois en recherche fondamentale et en médecine humaine et animale comme outils thérapeutiques ;

- l'approche alternative doit être mise en œuvre dès lors que la production *in vitro* a d'ores et déjà donné des résultats satisfaisants pour un antigène considéré dans les critères de performances définis dans la formulation du produit final ;
- il peut y avoir eu des échecs de la production *in vitro* en termes de quantité ou qualité souhaitée (affinité) ;
- de nouveaux anticorps sont en permanence produits contre de nouveaux antigènes ;
- la production *in vitro* ne peut être imposée en cas d'urgence sanitaire ;
- il n'est pas souhaitable que la production d'anticorps soit délocalisée dans des pays tiers où la réglementation en matière de protection animale est peu développée ;
- et des comités d'éthique en expérimentation animale évaluent les procédures expérimentales concernant la production d'anticorps par liquide d'ascite dans le cadre de l'autorisation de projet réglementaire ;

Le CNREEA adresse aux comités d'éthique les recommandations suivantes pour l'évaluation des projets traitant de la production d'anticorps par ascite :

- s'assurer que les antigènes pour lesquels la production d'anticorps par ascite est envisagée n'ont pas fait l'objet au préalable d'une production *in vitro* efficace (point 4.2 du formulaire d'autorisation de projet), telle que définie dans les considérants ci-dessus ;
- s'assurer que les demandeurs d'autorisation de projet apportent tous les éléments de justification du recours à l'animal (point 3.4.1 du formulaire de demande d'autorisation de projet) ;
- s'assurer que le nombre d'animaux est adapté à l'objectif (point 3.4.10) ;
- s'assurer que les points limites sont particulièrement bien décrits et témoignent d'une surveillance des animaux attentive (point 3.4.13) ;
- s'assurer que le demandeur renseigne suffisamment les procédures expérimentales et que l'utilisation d'antalgiques est prévue (point 4.2) ;
- dans tous les cas, il est indispensable que le demandeur se conforme au référentiel technique proposé ci-après, protocole qui a été actualisé au plus près des connaissances en la matière. Toute demande de dérogation à ce protocole devra être justifiée auprès du comité d'éthique en expérimentation animale lors de la demande d'autorisation de projet. Par ailleurs, le Comité national recommande, dans le cadre de l'article 7 de l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales, une appréciation rétrospective des projets « production d'anticorps par ascite chez la souris ».
- Le CNREEA reverra cette position avant le 30 juin 2019.

PROTOCOLE DE PRODUCTION D'ASCITE CHEZ LA SOURIS PROPOSE PAR LE CNREEA

La production d'anticorps monoclonaux par le biais de liquide d'ascite doit être effectuée de manière appropriée et justifiée eu égard à la douleur et/ou la détresse potentielles qu'elle peut générer chez l'animal. Le Comité national de réflexion éthique en expérimentation animale promeut le recours au protocole suivant qui permet de minimiser la douleur et/ou la détresse potentielles de l'animal.

Amorce intra péritonéale

On utilisera de préférence l'adjuvant incomplet de Freund ou un autre adjuvant moins invasif à la dose maximale de 0.3 ml par souris en une seule injection. Dans le cas de l'utilisation de pristane, en l'état des pratiques, le volume maximum injecté en intrapéritonéal sera de 0.5 ml par animal, et devra être précédé au moins 10 mn avant par l'injection en sous-cutané de **buprénorphine** (0.05 à 0.1 mg/kg) pour son action antalgique ou toute autre méthode équivalente.

*NB: diluer 1ml d'une solution de buprénorphine à 0.3mg/ml dans 29 ml de solution physiologique de NaCl 0.9% et injecter par voie sous-cutanée, **pour une souris de 20g**, 0.1 ml de cette solution (dose 0.05 mg/kg) ou 0.2 ml de cette solution (dose 0.1mg/kg).*

Injection intra péritonéale des hybridomes

L'injection des 10^6 à 10^7 cellules peut s'effectuer le lendemain de l'amorçage dans le cas où l'adjuvant de Freund a été utilisé. Dans le cas du pristane, il faut attendre au moins 7 jours avant l'injection des hybridomes.

Surveillance des animaux

Les souris doivent être pesées au moment de l'inoculation puis pesées quotidiennement à partir du 7^{ème} jour post-inoculation.

Le suivi quotidien des animaux doit être renforcé à partir du 10^{ème} jour. Les animaux présentant des signes de douleur et de détresse (réduction de l'activité, dos voussé, poils ébouriffés, difficultés respiratoires, vocalisation, perte d'appétit...) devront être euthanasiés selon une méthode réglementaire ou bénéficier d'une couverture antalgique efficace, et être ponctionnés selon une procédure terminale au plus tard dans les 48 heures.

Prélèvement du liquide d'ascite

Il s'effectue le plus souvent dans le cadre d'une procédure *unique terminale* : la souris est euthanasiée puis l'abdomen est ponctionné avec une aiguille. Il est recommandé que le prélèvement soit réalisé **avant** que le poids de l'animal n'excède **150 % de son poids initial** (pour une souris de 20g cela correspond donc à un poids de 30g). La surveillance quotidienne des animaux et le suivi des points limites seront l'élément majeur du déclenchement de la procédure. Les souris perdant souvent du poids lorsque la tumeur ascitique se développe, outre le critère du poids corporel, on veillera à mettre en place cette procédure avant que l'animal ait de réelles difficultés pour se mouvoir.

Le prélèvement peut aussi être effectué *en deux temps* :

□ 1^{ère} paracentèse abdominale sur l'animal anesthésié **avant une prise de poids, supérieure à 20%** (pour une souris de 20g, ne pas dépasser 25g), tout en respectant les règles d'asepsie. On privilégiera une anesthésie gazeuse. Le liquide d'ascite doit s'écouler librement de l'aiguille (18-22G) sans appliquer de pression négative. La ponction doit prélever un **maximum de 5 ml de liquide** d'ascite. L'abdomen de la souris est alors palpé pour détecter une éventuelle tumeur abdominale qui justifierait l'euthanasie de l'animal. Si aucune tumeur n'est palpable, il est recommandé d'injecter la moitié du volume prélevé en solution isotonique tiède, en sous-cutané,

en plusieurs points et sans excéder 2 ml au total. Une surveillance rapprochée de l'animal doit être assurée dans l'heure qui suit la paracentèse afin de déceler les signes de détresse éventuelle consécutifs à la ponction.

□ 2ème *paracentèse* effectuée 3 à 5 jours plus tard sur le même animal euthanasié cette fois avant le prélèvement.

D'une manière générale, **on privilégiera le prélèvement unique** qui limite d'une part les manipulations de l'animal toujours sources de stress pour l'animal et d'autre part le développement de tumeurs abdominales, parfois volumineuses qui limitent le volume de l'ascite produit rendant ainsi décevant le volume du second prélèvement.
