

AVIS DU COMITÉ NATIONAL DE RÉFLEXION ÉTHIQUE EN EXPÉRIMENTATION ANIMALE SUR L'UTILISATION D'ANTICORPS D'ORIGINE ANIMALE ET NON ANIMALE

OPINION OF THE NATIONAL COMMITTEE FOR ETHICAL REFLECTION IN ANIMAL EXPERIMENTATION ON THE USE OF ANTIBODIES OF ANIMAL AND NON-ANIMAL ORIGIN

Patrick GONIN¹, Sarah BONNET², Sandryne BRUYAS³, Nicolas DUDOIGNON⁴, Patricia LORTIC⁵,
Véronique MARY⁶, Pierre MORMEDE⁷

(Note présentée le 4 mai 2023, manuscrit accepté le 29 juin 2023)

Mots-Clés : anticorps, nano-anticorps, nouvelles approches méthodologiques

Keywords: antibodies, nanobodies, new approach methodologies

INTRODUCTION

Les anticorps sont une des lignes de défense naturelle de l'organisme. Ils sont produits par des lymphocytes B activés nommés plasmocytes. Ils ont chacun une spécificité vis-à-vis d'un domaine précis d'une protéine donnée, appelé épitope. Dans une réponse naturelle contre un organisme complexe étranger constitué de plusieurs protéines contenant de très grand nombre d'épitopes, de très nombreux clones de plasmocytes sont stimulés, aboutissant à un mélange d'anticorps monoclonaux, appelé mélange polyclonal. La spécificité étroite des anticorps monoclonaux en a fait depuis plus de 30 ans des

outils précieux de recherche, de diagnostic et, plus récemment mais en pleine expansion, de thérapeutique (Lu *et al.* 2020). Ces anticorps sont naturellement générés par des organismes vivants en réponse à la reconnaissance de protéines étrangères. Au fil des années, cependant, des techniques ont été mises au point pour produire en masse (après génération chez l'animal) mais aussi pour générer d'emblée (sans immunisation) des anticorps sans recours à l'animal.

En 2020, le laboratoire de l'Union Européenne pour les alternatives aux tests sur animaux (EURL ECVAM) a ainsi publié une recommandation sur l'utilisation d'anticorps d'origine non animale (Viegas Barroso *et al.* 2020). Cette démarche s'inscrit plei-

1. Responsable Plateforme Préclinique, ORCID : 0000-0001-6151-4580, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, UAR 3655, 114 rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France. Courriel : patrick.gonin@gustaveroussy.fr

2. Ecology and Emergence of Arthropod-Borne Pathogens unit, Institut Pasteur, Université Paris Cité, UMR CNRS 2000, USC INRAE 1510, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

3. Référente nationale bien-être animal, bureau du bien-être animal, Direction générale de l'alimentation, Ministère de l'agriculture et de la souveraineté alimentaire, 251 rue de Vaugirard, 75732 Paris, France

4. Chief Veterinary Officer. Sanofi, 78-88 Avenue Raspail, 94255 Gentilly, France

5. Fondation Assistance aux Animaux. 23, avenue de la République, 75011 Paris, France

6. Sanofi R&D, 1 avenue Pierre Brossolette 91085 Chilly-Mazarin, France

7. Président du Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale, ORCID : 0000-0003-0345-1432 ; Département de génétique animale, INRAE Centre de recherche de Toulouse, 31326 Castanet-Tolosan, France



nement dans l'objectif du remplacement des animaux utilisés à des fins scientifiques. En résumé, le document préconise d'arrêter d'utiliser des animaux pour la fabrication ou la production d'anticorps, quelle qu'en soit la raison (développement ou production) en recherche scientifique, pour des exigences réglementaires, ou pour des applications diagnostiques ou thérapeutiques. Il est aussi indiqué dans la recommandation 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. À 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* (DGFI 2020)).

Le Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale (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 s'est concentré en priorité, mais ne s'est pas limité, aux situations relevant d'autorisations de projets utilisant des animaux à des fins scientifiques.

MÉTHODES

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. Ce questionnaire a été diffusé à tous les établissements utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques (environ 600) et aux laboratoires de recherche INSERM et CNRS grâce à leurs bureaux Éthiques et modèles animaux (Brigitte Rault, Ivan Balansard). Les réponses obtenues (205) 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. Une revue bibliographique de l'état de l'art a aussi été effectuée, et le CNREEA a consulté des experts extérieurs au comité appartenant à des structures académiques comme privées (cités dans les remerciements).

UTILISATION ET PRODUCTION D'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) (Lu *et al.* 2020 ; Valldorf *et al.* 2021), il existe actuellement des exceptions, et il peut y avoir des situations particulières ou d'urgence nécessitant une production chez l'animal. En l'absence d'alternatives satisfaisantes, 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...). Sans donner une liste exhaustive, ils entrent essentiellement dans deux catégories : les sérums antivenimeux ou anti-toxines bactériennes (souvent utilisés sous ATU) (Morais *et al.* 2016), et les anti-thymocytes utilisés principalement comme thérapeutique anti-rejet de greffe (exemples : Thymoglobuline® en France, Atgam®, Grafalon®) sous AMM (Bamoulid *et al.* 2017, Gagelmann *et al.* 2017).

Produits diagnostiques

Des anticorps obtenus par immunisation d'animaux sont utilisés depuis de nombreuses années dans les trousse commerciales agréées de diagnostic de maladies infectieuses humaines ou animales (Siddiqui *et al.* 2010). 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 totalement 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 plus du produit lui-même, c'est sa méthode de production qui fait l'objet d'une autorisation d'utilisation en diagnostic *in vitro*.

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. Ces anticorps sont souvent des réactifs de référence, reconnus par la communauté scientifique pour leur efficacité et leur pertinence, et ne peuvent pas être aisément interchangeables. 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, notamment, par exemple, en anatomie pathologique.

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 (Stewart *et al.* 1989). 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 (CNREEA 2017).

ALTERNATIVES AUX ANTICORPS PRODUITS CHEZ LES ANIMAUX

Anticorps monoclonaux

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

À l'heure actuelle, il existe dans le monde plusieurs collections très étendues d'anticorps synthétiques (Lima *et al.* 2020, Moutel *et al.* 2016). 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 (IgG, IgM, IgA, etc.) et leur maturation (modifications post-traductionnelles). Cette maturation 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 que contre 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, par la suite, de produire ces anticorps 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 (Lu *et al.* 2020).

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 récapitulent jamais la totalité des performances des anticorps polyclonaux.

CONCLUSION

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, en 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 dé-

naturées, 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 (certains anticorps à usage thérapeutique ou diagnostique).

RECOMMANDATION (CNREEA 2022)

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 (CNREEA 2017). 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 (Chronopoulou *et al.* 2022) 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 (Stills *et al.* 2005), 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 cours 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 scientifiques 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.

REMERCIEMENTS

Remerciements à tous les membres du CNREEA, ainsi qu'aux experts extérieurs consultés : Thomas Bouquin (Sanofi), Franck Perez (Institut Curie), Patrick Hardy (Centre Lago), Stéphanie Antil-Delbeke (Bio-Rad), Caroline Davayat (Biomérieux).

CONFLITS D'INTÉRÊTS

Pas de conflit d'intérêt.

COMITÉ D'ÉTHIQUE

Non applicable.

BIBLIOGRAPHIE

- Bamoulid J, Crepin T, Gaiffe E, Laheurte C, Moulin B, Frimat L *et al.* Immune reconstitution with two different rabbit polyclonal anti-thymocytes globulins. *Transpl Immunol.* 2017 Dec;45:48-52.
- Chronopoulou E, Uribe-Benninghoff A, Corbett CR, Berry JD. Hybridoma Technology for the Generation of Rodent mAbs via Classical Fusion. In: Os-

sipow V, Fischer N, editors. *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 2014 [cited 2022 Jun 13]. p. 47–70. (Methods in Molecular Biology). Disponible à: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-992-5_4. Consulté le 14/07/23.

- CNREEA 2017. Recommandation sur la production d'anticorps par liquide

d'ascite chez la souris. 2017. Disponible à: https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/sites/default/files/content_migration/document/2_RECOMMANDATION_CNREEA_ASCITE-_27_avril_2017_1417163.pdf Consulté le 14/07/23.

- CNREEA 2022. Avis du CNREEA sur l'utilisation d'anticorps d'origine animale ou non animale V2. 2023. Disponible à :



<https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/sites/default/files/2023-02/avis-sur-l-utilisation-d-anticorps-d-origine-animale-ou-non-animale-valid-le-7-novembre-2022--26624.pdf>. Consulté le 02 mai 2023.

• DGFI. Antikörper aus Tieren bleiben unverzichtbar in Forschung und Klinik. 2020. Disponible à: <https://dgfi.org/die-dgfi-kaempft-fuer-die-weitere-nutzung-von-in-tieren-generierten-antikoerper-in-forschung-und-klinik-und-informiert-seine-mitglieder-ueber-die-wissenschafts-feindliche-empfehlung-des-eu-referenzlab/> Consulté le 14/07/23.

• Gagelmann N, Ayuk F, Wolschke C, Kröger N. Comparison of Different Rabbit Anti-Thymocyte Globulin Formulations in Allogeneic Stem Cell Transplantation: Systematic Literature Review and Network Meta-Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017 Dec;23(12):2184-2191

• 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.

• Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, Wu HC. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci.* 2020 Jan 2; 27(1):1.

• Morais V. An Old Solution for a new problem: Antiserum against Emerging infectious Diseases. *Front Public Health.* 2016 Aug 26;4:178.

• 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.

• Siddiqui MZ. Monoclonal antibodies as diagnostics; an appraisal. *Indian J Pharm Sci.* 2010 Jan;72(1):12-7.

• Stewart F, Callander A, Garwes DJ. Comparison of ascites production for monoclonal antibodies in BALB/c and BALB/c-derived cross-bred mice. *J Immunol Methods.* 1989 May 12; 119(2): 269-75.

• Stills HF. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J.* 2005;46(3):280–93.

• Valldorf B, Hinz SC, Russo G, Pekar L, Mohr L, Klemm J *et al.* Antibody display technologies: selecting the cream of the crop. *Biol Chem.* 2021 Mar 23;403(5-6):455-477.

• Viegas Barroso JF, Halder ME, Whelan M. EURL ECVAM Recommendation on Non-Animal-Derived Antibodies. JRC Publications Repository. 2020. Disponible à: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC120199>. Consulté le 14/07/23.