



Le présente information technique est une version actualisée de la directive « Production d'anticorps monoclonaux 5.01 ». On a actualisé les renvois aux textes de lois. *On a biffé, mis en italique et grisé passages caducs.*

Juillet 2017

Information technique expérimentation animale

Production d'anticorps monoclonaux 5.01

A Buts et champ d'application

Cette information technique vise à obtenir que les **expériences sur animaux en vue de produire des anticorps monoclonaux (procédé de l'ascite) ne soient plus effectuées qu'exceptionnellement.**

La information technique détermine pour ces cas exceptionnels les conditions cadre devant être respectées lors de l'exécution du procédé de l'ascite.

La information technique s'adresse aux **autorités cantonales** chargées de l'exécution de la législation sur la protection des animaux dans le domaine de l'expérimentation animale, à leurs **commissions consultatives** ainsi qu'à toutes les **personnes ayant l'intention de produire des anticorps monoclonaux** (directeurs d'expérience, gardiens d'animaux, personnel de laboratoire).

Cette troisième édition ne diffère pas matériellement de la deuxième. Elle reprend une partie du document d'information précédent sur les anticorps monoclonaux sous la forme d'un glossaire.

B Bases légales

Les expériences qui causent aux animaux des douleurs, des maux ou des dommages, les mettent dans un état de grande anxiété ou peuvent perturber notablement leur état général, doivent être limitées à l'indispensable (art. 17, de la loi du 16 décembre 2005 sur la protection des animaux, LPA, RS 455).

Lors de l'exécution d'une expérience, des douleurs, maux ou dommages ne peuvent être imposés à un animal que si le but visé ne peut pas être atteint d'une autre manière (cf. art. 20, LPA).

L'autorité cantonale ne peut pas autoriser une expérience si son but peut être atteint par des méthodes qui sont fiables d'après l'état actuel des connaissances et qui ne nécessitent pas d'expériences sur animaux (art. 137, al. 2, OPAn).

Les anticorps monoclonaux peuvent en principe être obtenus par des cultures de cellules (in vitro) et il n'est donc pas indispensable de les produire par le procédé de l'ascite. Selon l'état actuel des connaissances, les méthodes in vitro utilisées dans la pratique doivent être considérées comme fiables dans la plupart des cas. Il y a néanmoins des cas particuliers où les procédés par cultures de cellules ne conduisent pas au but visé. La question se pose dès lors de savoir pour quels

cas d'exception l'obtention d'anticorps monoclonaux dans une expérience sur animaux peut être admise par la loi et donc autorisée.

En 1989, tous les requérants et toutes les requérantes ont été informés que la production (l'obtention) d'anticorps monoclonaux par le procédé de l'ascite n'était en principe pas compatible avec la loi sur la protection des animaux et que les demandes d'autorisation devaient être dorénavant évaluées de plus en plus sévèrement dans le but de faire disparaître d'ici quelques années la production in vivo utilisant des animaux. Dans sa troisième version, la présente directive précise une nouvelle fois ce qui avait déjà été établi dans la seconde version, c'est-à-dire les exceptions et les délais transitoires pour l'introduction des méthodes in vitro.

C Principes pour l'octroi d'une autorisation

- 1 **En règle générale**, les **demandes d'autorisation** pour la production d'anticorps monoclonaux dans une expérience sur animaux (procédé de l'ascite) **sont à rejeter**.
- 2 **Exceptions:** Les demandes en vue d'utiliser le procédé de l'ascite peuvent être exceptionnellement autorisées dans les cas suivants:
 - a. Obtention d'anticorps monoclonaux à des fins diagnostiques ou thérapeutiques en **médecine humaine**, lorsqu'il s'agit d'**urgences** (p. ex. de thérapies de quelques patients);
 - b. Maintien de certaines lignées d'hybridomes, lorsqu'on peut établir qu'elles se **développent mal ou s'infectent** dans la culture de cellules.
- 3 **Solution transitoire:** Des demandes pour la production d'anticorps monoclonaux utilisant des animaux peuvent être autorisées selon le principe de la proportionnalité **jusqu'à fin 1994 au plus tard** (en accordant un délai transitoire pour introduire les méthodes in vitro dans un laboratoire), lorsque le requérant ou la requérante
 - a. peut apporter une preuve satisfaisante que les anticorps monoclonaux nécessaires ne peuvent être obtenus en quantité suffisante par **les méthodes in vitro simples** (cultures stationnaires, cultures en spinners et cultures en rotation, jusqu'à un nombre déterminé de flacons) et
 - b. peut présenter **un plan pour l'introduction des méthodes in vitro** qui contient des indications réalistes et suffisantes sur les délais, les moyens financiers et les locaux prévus.

D Demandes d'autorisation

- 1 Des **demandes séparées** doivent être adressées pour:
 - a. le procédé d'immunisation d'animaux d'expérience afin d'obtenir des lymphocytes en vue de l'hybridation;
 - b. le procédé de l'ascite pour la production d'anticorps monoclonaux à des fins diagnostiques ou thérapeutiques chez l'homme;
 - c. le procédé de l'ascite pour maintenir certaines lignées d'hybridomes, lorsqu'elles sont infectées ou ne se développent pas suffisamment;
 - d. le procédé de l'ascite pour la production d'anticorps monoclonaux en tant que solution transitoire, limitée dans le temps.

Les demandes ne doivent contenir aucun autre projet d'expériences (p. ex. la production de sérums polyclonaux chez le lapin).

- 2 Pour les **demandes concernant le procédé d'immunisation pour l'obtention de lymphocytes**, des informations complémentaires sont nécessaires (cf. ch. 1^{er}, let. a ci-dessus). Elles concernent:
- les antigènes utilisés;
 - le nombre et la désignation exacte (souches animales) des animaux qui sont utilisés pour les divers antigènes;
 - le **procédé d'immunisation** exact (y compris les adjuvants) et la durée approximative jusqu'au prélèvement de la rate.
- 3 Pour les **demandes concernant le procédé de l'ascite pour la production d'anticorps monoclonaux**, des informations complémentaires sont nécessaires (cf. ch. 1^{er}, let. b ci-dessus). Elles concernent:
- le **but d'utilisation** des anticorps monoclonaux et les quantités nécessaires à ce but (par rapport au nombre de tests) (cf. chap. C, ch. 2);
 - l'**utilisation des anticorps** dans le même institut ou pour l'échange/la vente;
 - la production d'anticorps **nouveaux ou connus**;
 - le **nombre des divers anticorps monoclonaux** (ou des hybridomes) et les **quantités** de production prévues;
 - le nombre et la désignation exacte des espèces d'animaux (y compris les souches animales) qu'il est prévu d'utiliser pour la production d'anticorps monoclonaux;
 - l'emploi et l'application de substances irritantes pour le traitement préalable de la cavité abdominale (p. ex. Pristan);
 - la durée entre le traitement préalable et l'induction de la tumeur;
 - la durée prévue entre l'induction de la tumeur et le prélèvement des anticorps;
 - le cas échéant, le **plan pour l'introduction de méthodes in vitro** (cf. chap. C, ch. 3).

E Conditions cadre pour l'utilisation du procédé de l'ascite

L'autorisation doit être liée aux conditions suivantes (**charges sous chiffre 22 de la Formule B:**)

- Contrôles fréquents** de l'état général des animaux, au moins une fois par jour, également en fin de semaine et les jours fériés.
- En règle générale, mise à mort des animaux avant le prélèvement de l'ascite (**pas de ponction répétée de la cavité abdominale**). Une ou deux ponctions sur l'animal vivant peuvent être exceptionnellement autorisées, lorsque les requérants peuvent apporter une preuve suffisante qu'il faudrait, dans le cas contraire, utiliser un nombre disproportionné d'animaux.
- Si la ponction de l'ascite sur l'animal vivant est autorisée, **les dates de chaque expérience doivent être communiquées aux autorités** (possibilité d'un contrôle).

- d. Mise à mort immédiate des animaux d'expérience dès les premiers signes évidents d'une altération de leur état général (apathie, inappétence, signes de douleurs).
- e. Les animaux dont le **poids augmente de plus de 20 %** durant l'expérience doivent être tués sans délai en vue du prélèvement de l'ascite.

F Contrôle de l'exécution de l'expérience

Lorsque le **procédé de l'ascite est utilisé**, les autorités cantonales d'exécution sont tenues de **contrôler** fréquemment le respect des conditions cadre.

OFFICE FEDERAL DE LA SECURITE ALIMENTAIRE ET DES AFFAIRES VETERINAIRES

Glossaire

Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont des substances immunobiologiques qui réagissent de façon hautement spécifique avec certaines structures cellulaires. Ils sont utilisés en immunologie, virologie et biochimie ainsi que dans d'autres domaines de recherche pour de nombreux tests. Le diagnostic moderne ne peut plus s'en passer (ELISA). Leur importance va encore s'accroître à l'avenir. En arrivant à produire des anticorps monoclonaux, on a pu cerner de plus près des problèmes importants tels que la lutte sélective contre des cellules cancéreuses, le dépistage précoce du cancer et d'autres maladies ainsi que la possibilité de produire des immunoglobulines (sérum spécifique) à des fins thérapeutiques. Des milliers d'anticorps monoclonaux différents (dont beaucoup de conjugués) sont offerts par diverses firmes, surtout aux USA, en Grande-Bretagne et en Hollande. En outre, de nombreux groupes de chercheurs développent leurs propres anticorps monoclonaux pour l'élucidation de questions spécifiques. Différentes quantités d'anticorps monoclonaux sont nécessitées selon le domaine où ils sont employés.

Technique des hybridomes

En 1975, Köhler et Milstein ont publié leur travail sur le principe de la production d'anticorps monoclonaux: l'animal, la plupart du temps une souris, est immunisé à plusieurs reprises à l'aide d'antigènes. Après des semaines ou des mois, l'animal est sacrifié et on prélève la rate. Parmi les cellules de la rate se trouvent des lymphocytes B qui produisent des anticorps, entre autres aussi des anticorps dirigés contre l'antigène utilisé. Les cellules de la rate sont mises en contact avec des cellules myélomateuses (cellules cancéreuses du système sanguin). Elles fusionnent pour former des cellules hybrides. Divers procédés chimiques de sélection ont pour effet que seules les cellules hybrides (cellules cancéreuses produisant des anticorps) survivent dans le milieu de culture. Elles peuvent être isolées (clonées), si bien que la culture issue d'une seule cellule ne produit qu'un anticorps déterminé. Les clones de cellules hybrides, qui réagissent avec l'antigène, sont cultivés. Etant donné que dans le cas des hybridomes (lignées de cellules hybrides) il s'agit de lignées de cellules constantes, on peut continuer la culture et obtenir ainsi des anticorps monoclonaux.

Procédé de l'ascite

En vue d'obtenir des quantités plus importantes d'anticorps monoclonaux, du Pristan (huile minérale) est injecté par voie intrapéritonéale à des souris, ce qui provoque une irritation de la cavité abdominale mais pas encore d'ascite (épanchement de liquide dans la cavité abdominale). Le plus souvent, on utilise des souches de souris immunodéficientes (souris nues), vu que chez celles-ci les tumeurs implantées ultérieurement se développent mieux. Une à trois semaines après l'injection de Pristan, des hybridomes (10^6 à 10^7 cellules) sont injectées dans la cavité abdominale des souris. Au courant des 10 à 25 jours suivants, la tumeur se développe dans toute la région péritonéale et, durant le processus de multiplication, les cellules produisent des quantités importantes d'anticorps monoclonaux. On les retrouve dans l'ascite qui s'est développée. Lorsque l'ascite a atteint un certain volume, on ponctionne la cavité abdominale avec une canule (ce qu'on appelle aussi "la traite"). Ce procédé peut être répété environ 2 à 3 fois par semaine, jusqu'à ce que la tumeur se soit développée au point que la survie de la souris n'est plus garantie. Suivant la lignée de cellules myélomateuses utilisée, la tumeur évolue plus rapidement et plus agressivement, si bien que l'on peut prélever plus rapidement l'ascite et que les souris doivent être tuées plus tôt. Chez un certain pourcentage des souris aucun ascite ne se développe, empêchant ainsi une récolte d'anticorps. L'ascite prélevée contient, sous forme concentrée, les anticorps monoclonaux qui peuvent être utilisés souvent sans rinçage. Le procédé de l'ascite est une expérience sur animaux provoquant un très grand stress.

Procédé par culture de cellules

Suivant la quantité d'anticorps nécessaire, on poursuit sur une plus ou moins grande échelle la culture des hybridomes sélectionnés produisant les anticorps désirés in vitro. Le milieu ajouté pour la nutrition des cellules contient du sérum de fœtus de veau. Après l'adaptation des lignées de cellules, on peut souvent utiliser un milieu exempt de sérum. Pour la culture de cellules, on utilise des flacons (flacons pour cultures en rotation (Rollerkulturen) d'un contenu de 0,5 à 1 l, flacons pour cultures selon Spinner d'un contenu de 1 à 10 l), des réacteurs capillaires (principe de la dialyse) ou des fermenteurs de capacités diverses (10 à 1000 l). Depuis peu on peut se procurer des petits fermenteurs spécialement conçus en vue de l'importance de la production en laboratoire (mini-bioréacteurs comprenant un système de fibres creuses). La quantité d'anticorps qu'une cellule peut produire au maximum par unité de temps et que l'on retrouve dans le surnageant est limitée. Pour cette raison, il est donc important d'atteindre dans les systèmes de culture de cellules une densité de cellules aussi élevée que possible. On n'obtient des densités élevées de cellules que si les conditions de croissance pour l'hybridome concerné ont été optimisées et que celui-ci ait reçu suffisamment de substances nutritives. Toutes les lignées d'hybridomes ne se laissent pas cultiver in vitro avec le même succès. Quelques-unes exigent un milieu de culture et des facteurs de croissance très spécifiques. La quantité d'anticorps produite varie également selon la lignée de cellules myélomateuses utilisée. Le surnageant des cultures de cellules contient les anticorps, mais à une concentration beaucoup plus faible que l'ascite. Des souillures (protéines étrangères, provenant p. ex. du sérum de fœtus de veau) et la faible concentration en anticorps rendent nécessaires le rinçage et la concentration du surnageant, ce qui est techniquement difficile et onéreux.