



Bref'OPAL n°8 - Février 2017- La réduction dans les DAPs

Chers Amis de l'OPAL,

Nous avons le grand plaisir de vous proposer ce huitième numéro de notre lettre électronique, Bref'OPAL. Ce numéro concerne la valorisation de la réduction dans les demandes d'autorisations de projets (DAPs).

De nombreux concepteurs ont des problèmes de présentation et de mise en exergue claire (« valorisation ») de leurs actions concrètes en faveur de la réduction lors de la rédaction des DAPs. Nous allons donc tenter de faire le point sur ce sujet moins simple qu'il n'y paraît de prime abord. En effet, il est important d'être capable de démontrer au comité d'éthique et à l'autorité comment concrètement cette préoccupation de réduction s'est traduite dans les faits dans le projet spécifique qui est présenté. Cette traduction concrète doit également être répercutée dans son esprit et ses principes au niveau du résumé non technique, qui est rappelons le encore, à destination du grand public.

Il y a deux façons d'aborder ce sujet. La première est de regarder, parmi les actions qui sont théoriquement reconnues comme potentiellement contributives d'une réduction, lesquelles (et comment) s'appliquent au projet que nous sommes en train de rédiger.

L'autre possibilité est de réfléchir sans idée a priori, sans plan préexistant, sur le fait de réduire le nombre d'animaux prévus pour le projet, et donc sans utiliser un panel prédéfini d'actions possibles. Ceci ne permet souvent pas d'incrémenter beaucoup d'actions efficaces de réduction, et pourtant c'est ce voient encore trop souvent les membres de comité d'éthique. Le déposant, dans ce cas, va essayer de calculer « au plus juste » le nombre d'animaux requis (ce sera l'essentiel de la démarche de réduction du projet), et dans le meilleur des cas, d'utiliser des témoins communs, voire de présenter des expériences qui ne se réaliseront peut être pas (ceci est parfaitement valide, mais ne constitue pas un effort dans le sens de la réduction).

Ces approches ne sont pas exclusives, mais la première permet donc de ne rien oublier et de passer toutes les possibilités théoriques en revue, et d'appliquer celles qui peuvent l'être, tandis que la deuxième conduit souvent à des insuffisances importantes.

Avant de mettre en place une réflexion conduisant à une éventuelle obligation d'utiliser des animaux à des fins scientifiques pour répondre à une question, les chercheurs doivent forcément avoir obtenu des données préalables (certaines souvent in vitro). Celles-ci doivent être rapidement résumées (§ 3.3.2) au titre du remplacement (le point d'épuisement des méthodes de

substitution a effectivement été atteint, le projet est arrivé dans une impasse, l'utilisation d'animaux est indispensable), et de la réduction. En effet, tout criblage et aussi toute expérimentation antérieure avec ou sans animaux doit avoir été examinée, évaluée et épuisée avant de considérer le vivo. A ce stade, le « design » d'expériences utilisant des animaux peut probablement être envisagé. Nous ne nous étendrons pas plus sur cette partie qui concerne essentiellement le remplacement, notre propos ici étant la mise en œuvre et en exergue de la réduction dans les DAPs.

Passons donc en revue les possibilités théoriques connues de réduction, non sans avoir posé un préalable très important. La première action, qui n'est pas en soi de la réduction est bel et bien de calculer précisément (et en utilisant une méthode de mathématiques appliquées dérivée du calcul de puissance) le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, de sujets, qui vont permettre de répondre à la question ou à une sous-question du projet. Ceci implique de poser des questions claires afin de définir des lots subissant des conditions prédéfinies, avec une ou plusieurs variables mesurées (unités, modalités, périodicité de mesure décidées). Les investigateurs cliniques qui font de la recherche sur les êtres humains sont très habitués à cet exercice. Le nombre peut être impacté par les méthodes d'analyse prévues, et là on pourra parler de réduction liée à des méthodes statistiques. Ce point est important, car si toutefois les concepteurs prévoient un nombre d'animaux insuffisant, c'est tout le projet qui sera caduc et par là même, l'utilisation des sujets enrôlés inutile, ce qui serait évidemment contraire à l'éthique la plus élémentaire.

La justification précise du nombre d'animaux à utiliser est requise pour une évaluation éthique mais n'est pas en soi une méthode de réduction. Cette justification peut ne pas faire appel à des calculs de puissance. C'est le cas dans l'enseignement, les maintiens de lignées, la production de tissus ou d'anticorps, par exemple. Dans ce cas, le rationnel sera exact mais différent.

Il existe des méthodes statistiques qui permettent d'obtenir plus d'informations à partir d'un seul et même animal. Citons comme exemple les méthodes statistiques d'analyse longitudinale : on suit l'animal dans le temps sur un paramètre donné mesurable (exemples : poids corporel, volume de tumeur, courbes de type survie, etc). Dans ce cas, il est possible de prévoir les méthodes de modélisation de l'évolution de ce phénomène (linéaire ou non), puis l'analyse des résultats par comparaisons statistiques des courbes d'évolution. Il est évident que quand l'utilisation de telles méthodes est possible, le nombre d'animaux requis pour démontrer un effet significatif sera grandement réduit par rapport au cas caricatural (mais courant) ou les expérimentateurs vont attendre un temps unique prédéfini (la fin de la procédure expérimentale), auquel ils recueilleront les données puis les analyseront au moyen de méthodes simples de comparaison (type test de Student, de Mann-Whitney-Wilcoxon ou analyse de variance à un temps de mesure). L'utilisation de certaines méthodes statistiques, dans des conditions bien définies, peut donc contribuer à la réduction. A contrario, il n'est pas possible de considérer que le simple fait d'appliquer en général des méthodes statistiques permettra systématiquement une réduction (ceci serait un abus de langage, en effet, le simple calcul du nombre d'animaux nécessaire et suffisant ne constitue pas en soi un point de réduction, mais simplement une application des bonnes pratiques et de l'éthique).

D'autres stratégies pour réduire le nombre d'animaux existent, par augmentation de la puissance. Par exemple, pour des études exploratoires ou de faisabilité, il est possible de prendre un risque de première espèce plus élevé (10% au lieu de 5% par exemple). On peut aussi choisir des variables non catégorielles (celles-ci demandent en effet des échantillons plus grands), mais plutôt des variables continues. L'ajout de covariables qui expliquent une partie de la variation du paramètre étudié peut permettre d'augmenter la puissance sans augmenter le nombre d'animaux (exemples de covariables à introduire dans un modèle linéaire pour analyse de variance: sexe, âge, portée, personne performant les expériences, etc ...).

Les chercheurs doivent aussi démontrer les efforts qu'ils ont faits en vue de contrôler la variabilité de la réponse (mesure du paramètre décidé pour la recherche en vue), et la précision de sa mesure. En effet, le contrôle, dans des plages prédéfinies, des paramètres environnementaux, sanitaires et génétiques sera un facteur de diminution de la variabilité de la réponse mesurée et donc de réduction. La raison en est simple : le calcul du nombre de sujets nécessaires dépend de la différence attendue entre les deux moyennes des lots à comparer et aussi de la variance du phénomène mesuré, qui elle-même dépend de la standardisation des conditions expérimentales. Les concepteurs devront donc s'attacher à démontrer la prise en compte de cette standardisation sur les trois plans cités plus hauts (environnement, sanitaire, génétique), voire sur d'autres, en fonction du phénomène étudié.

Au niveau méthodologique, le choix et le nombre des sujets témoins (contrôles) sont des aspects très importants. Tout témoin doit être correctement justifié et la possibilité ou pas d'utiliser des lots témoins communs non traités par exemple pour différents lots traités doit être évaluée, justifiée et pourra être éventuellement constitutive d'un facteur de réduction.

Toute méthode qui permet de récupérer le plus d'informations pertinentes possibles à partir de chaque animal permettra une optimisation (une des facettes du raffinement), mais aussi de la réduction présente ou future, puisque le recueil d'un maximum de données et leur partage permettront d'éviter des duplications futures. A ce chapitre, il faut citer la surveillance quotidienne avec le recueil écrit de tous les événements, ce qui s'inscrit dans la pathologie clinique (in vivo). L'utilisation de méthodes de criblage à haut débit, l'imagerie in vivo (le même animal peut être imagé plusieurs fois) sont des méthodes plus puissantes (au sens mathématique : voir ci-dessus) et peuvent donc contribuer à la réduction : charge au concepteur de démontrer comment s'il retient ces modalités.

Le fait d'utiliser des modèles plus ciblés, plus fins, plus pertinents (exemple : récapitulation des mutations génétiques à l'origine d'un type de cancer dans une souris triple transgénique construite par la technique CRISPR Cas9 (directement sur le fond génétique souhaité) va participer à la réduction par rapport à une approche sur des animaux non modifiés génétiquement dans lesquels l'évaluation de l'impact d'une combinaison thérapeutique sera inefficace et nécessitera, si elle est tentée, un grand nombre théorique d'animaux.

La Directive 2010/63 UE et ses textes de transposition prévoient aussi deux autres dispositions importantes pour contribuer à la réduction.

La première est de présenter les mesures prises pour vérifier l'absence de duplication d'expériences déjà effectuées localement ou internationalement. Les concepteurs devront donc s'attacher à démontrer qu'ils ont réalisé et réalisent en permanence une veille scientifique, et une intégration efficace de leurs données dans une base au moins locale (facilement disponible à leur communauté ou au plus grand nombre dans le cas de recherche académique).

La seconde est de présenter les mesures de récupération et de stockage des organes et tissus normaux ou d'intérêt en une banque locale de tissus ou de fluides. En effet, la constitution de ce type de banque est un facteur de réduction futur dans la mesure où elle permet d'éviter de commander des animaux pour les mettre directement à mort aux fins de récupération d'organes ou de tissus.

Pour finir, il nous semble important de revenir sur un point méthodologique important. Il est classique en science de « confirmer » les résultats en réalisant les expériences deux fois en trois fois indépendamment. Cette règle qui semble sacro-sainte dans de nombreux laboratoires (non problématique pour des western-blot par exemple et de bonne pratique en biologie cellulaire) pose problème vis-à-vis de nombreux chercheurs et comités d'éthique. En l'occurrence, il s'agit ici d'un problème méthodologique. En effet, comme pour des essais cliniques lors des différentes phases de développement d'un médicament, il ne viendrait à l'idée de personne de répéter 3 fois une phase I pour avoir confiance dans les résultats. La raison en est simple : le nombre de sujet est calculé a priori pour conclure statistiquement sur l'effet d'un médicament sur des critères principaux et secondaires. Par la suite, les résultats sont calculés selon les mêmes hypothèses qu'au départ, et rendent une probabilité d'efficacité. Le fait de répéter une expérience nécessite un traitement statistique particulier, avec des hypothèses de départ différentes. Ce qui n'est pas correct est, en gardant les hypothèses de départ, de compiler les résultats des expériences répétées pour déterminer une probabilité de réussite. En effet, dans ce cas, ceci revient à faire baisser artificiellement le risque d'échec alors que les hypothèses de départ restent les mêmes. Vis-à-vis du comité et des méthodologistes, si les chercheurs doivent faire des répétitions de leurs expériences, ils doivent impérativement démontrer pourquoi elles sont indispensables, et pourquoi le nombre total final de sujets est requis. Cependant, la répétition pour « confirmer » n'est pas, en elle-même, une justification valide, et elle va typiquement à l'encontre de la réduction.

Dans tous les cas, et pour conclure, une bonne partie de ce qui se rapporte à la réduction est en rapport avec la méthodologie d'une part et avec les probabilités et les statistiques d'autre part. Il est donc important de s'assurer de la collaboration de professionnels compétents (consultants si nécessaire) dans le domaine des statistiques pour tout projet visant l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques.

Nous espérons que ce Bref'OPAL vous sera utile pour la rédaction de vos « DAP » et vos réflexions éthiques.

Le CA de l'OPAL vous souhaite une excellente rentrée, la réussite de vos travaux en cours, et vous donne rendez-vous pour notre prochaine lettre électronique.