

LES TROIS R DE L'EXPÉRIMENTATION ANIMALE ÉTHIQUE

DATE DE RÉVISION : Avril 2020

Objectifs

Les objectifs de ce module sont les suivants :

- définir les Trois R introduit par Russell et Burch en 1959;
- introduire le concept de solutions de remplacement pour la recherche, l'enseignement et les essais;
- examiner les perspectives et les limites des solutions de remplacement;
- présenter des exemples de solutions de remplacement et déterminer comment elles peuvent être mises en pratique.

Table des matières

Introduction.....	1
Notion de remplacement, réduction et raffinement.....	2
Principes du remplacement.....	2
Principes de la réduction.....	5
Principes du raffinement.....	7
Conclusion.....	9
Références.....	9

Introduction

La question de la douleur et de la détresse chez les animaux utilisés pour la recherche, l'enseignement et les essais préoccupe depuis longtemps les scientifiques et le public. C'est cette préoccupation, combinée à l'utilisation accrue des animaux en recherche fondamentale et appliquée, qui a incité la Universities Federation of Animal Welfare à engager W.M.S. Russell et R.L. Burch pour examiner comment la recherche pourrait être effectuée de manière plus éthique.

Les Trois R signifient la réduction, le remplacement et le raffinement. Dans leur livre *The Principles of Humane Experimental Technique* publié en 1959, les auteurs Russell et Burch proposent d'évaluer tout projet de recherche faisant appel à l'utilisation d'animaux pour déterminer s'il est possible d'appliquer les Trois R. Ils ont souligné que bien que le remplacement des animaux en tant que sujets de recherche était un objectif souhaitable, des gains importants pourraient être réalisés en science éthique en réduisant le nombre d'animaux utilisés et en améliorant les procédures effectuées sur ceux-ci. Au cours des quarante dernières années, les Trois R sont devenus largement acceptés comme des principes d'éthique et ils sont maintenant intégrés dans les pratiques scientifiques faisant appel aux animaux, au Canada et dans de nombreux pays du monde.

De nombreux organismes internationaux responsables d'établir des normes pour le soin et l'utilisation des animaux en expérimentation, dont le Conseil canadien de protection des animaux, exigent des chercheurs qu'ils examinent la mise en œuvre des Trois R lors de la conception des expériences faisant appel aux animaux. Le chercheur principal doit examiner s'il est nécessaire d'utiliser des animaux et, si tel est le cas, il doit tenir compte des Trois R. Le protocole soumis au comité de protection des animaux doit justifier l'utilisation d'animaux et énumérer les bases de données consultées par le chercheur pour en arriver à la conclusion qu'il n'existe pas d'autres solutions de remplacement des animaux. Le protocole doit aussi préciser le concept expérimental pour assurer que le nombre approprié d'animaux sera utilisé, et noter tous les raffinements possibles comme l'hébergement et les soins qui ont été considérés pour réduire au minimum les effets négatifs sur les animaux.

Le terme « alternatives » est apparu en 1978 après la publication du livre *Alternatives to Animal Experiments*. L'auteur, le physiologiste David Smyth, alors président de la UK Research Defence Society, y définit « alternatives » dans le domaine des Trois R, à savoir : « toute modification aux procédures qui a pour résultat le remplacement de l'utilisation des animaux, la réduction du nombre d'animaux utilisés ou le raffinement des techniques qui peuvent réduire la douleur chez les animaux [notre traduction] ». Bien que plusieurs tentatives aient été faites pour limiter le sens du terme « alternatives » à « remplacement », c'est dans le contexte plus large de sa définition première que les solutions de remplacement seront discutées dans le présent module.

Notion de remplacement, réduction et raffinement

Comme déjà mentionné, le terme « alternatives » est utilisé pour définir tout changement à des procédures existantes qui a pour effet le remplacement des animaux, la réduction du nombre d'animaux utilisés, ou le raffinement des soins et des procédures pour réduire la douleur, le stress et la détresse chez l'animal.

Le **remplacement** consiste à adopter des méthodes qui évitent ou remplacent l'utilisation des animaux dans un domaine où il est d'usage de les utiliser. Ces solutions comprennent à la fois les remplacements complets (p. ex. le remplacement des animaux par des systèmes inanimés, comme un programme d'ordinateur) et les remplacements relatifs (p. ex. le remplacement d'un vertébré ou d'un animal dont la capacité cognitive est supérieure à celle d'un autre animal dont le potentiel de perception de la douleur est considérablement moindre selon les conseils de pairs et l'interprétation actuelle des données probantes, comme c'est le cas pour certains invertébrés).

La **réduction** désigne toutes les solutions qui diminuent le nombre d'animaux utilisés dans le but d'obtenir suffisamment de données pour répondre aux questions relatives à l'étude, ou qui portent au maximum l'information obtenue de chaque animal, limitant ou évitant possiblement l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, sans compromettre le bien-être animal.

Le **raffinement** désigne les modifications apportées aux soins et à la gestion des animaux, ou aux procédures expérimentales afin de réduire la douleur et la détresse chez les animaux, ainsi que d'améliorer le bien-être des animaux utilisés en science, et ce, pendant toute leur durée de vie.

Principes du remplacement

Cette section traite du remplacement dans le cadre de la recherche, de l'enseignement et des essais.

Principes généraux ayant trait aux solutions de remplacement pour la recherche, l'enseignement et les essais

Dans les études où il est nécessaire d'observer ou d'utiliser isolément des processus particuliers (cellulaires ou moléculaires), les solutions de remplacement comme les cultures de cellules, de tissus ou d'organes ou les cultures bactériennes sont d'excellentes options. Certains des facteurs de variation qui compliquent la recherche chez les animaux intacts sont réduits lorsque ces cultures sont utilisées, notamment les facteurs comme la lumière, le bruit et les infections latentes. Évidemment, les variations de ce type ne devraient pas être un facteur si des solutions de remplacement inanimées sont utilisées.

Les systèmes biologiques sont reconnus pour leur complexité et leurs comportements inattendus avec l'apparition d'artefacts. Un système beaucoup plus simple comme celui de la lignée cellulaire ne produira probablement pas d'artefacts, pourvu que les cellules soient conservées dans un milieu adéquat, qu'elles soient caractérisées de façon appropriée, et qu'elles ne soient pas contaminées

par un mycoplasme. Un corollaire du problème d'artéfacts est la simplicité avec laquelle l'environnement des cellules peut être altéré, ce qui ne peut être fait avec un animal intact. Par exemple, il est facile de modifier le pH, la teneur en ions, la concentration d'oxygène ou un autre facteur d'un milieu de culture afin d'étudier les effets de ces modifications. Un bon contrôle de toutes les variables devrait accroître la reproductibilité de ces études. Lorsque de nouvelles lignées cellulaires sont nécessaires, il devrait être possible d'obtenir plusieurs autres cultures de chaque animal et, par conséquent, de réaliser plus d'expérimentations, que si l'animal entier était utilisé dans une étude.

Par exemple, si la solution de remplacement est une vidéo ou un modèle informatique, il peut quand même être nécessaire d'utiliser un petit nombre d'animaux pour produire la vidéo ou élaborer le programme d'ordinateur.

Bien que les cultures cellulaires, les bactéries et les modèles inanimés ne puissent être utilisés pour étudier les processus tels qu'ils se dérouleraient dans un organisme entier et vivant, l'évolution de la technologie permet de produire des modèles d'organoïdes *in vitro* qui sont utilisés pour étudier une gamme de processus biologiques *in vivo* incluant la régénération des tissus, la fonction des niches de cellules souches, et la réaction des tissus aux médicaments, aux mutations ou à l'endommagement. Les réactions comportementales sont plus difficiles à étudier chez les organoïdes humains. Le comportement des organismes simples (p. ex. les bactéries et les nématodes) peut être étudié, mais toute extrapolation au comportement d'organismes plus complexes est extrêmement difficile. Dans le même ordre d'idées, il serait impossible d'étudier des phénomènes propres à l'espèce et au sexe en utilisant des organismes simples ou des modèles inanimés.

Solutions de remplacement pour la recherche

Recherche fondamentale

Les animaux ont grandement été utilisés pour l'étude des principes fondamentaux de biologie. Les chercheurs ont souvent utilisé des espèces chez lesquelles la physiologie et la biochimie des animaux étaient similaires à celles des humains. Plusieurs processus fondamentaux sont communs à un large éventail d'organismes, incluant les invertébrés.

Solutions de rechange

L'utilisation d'animaux d'espèces inférieures, dont la capacité cognitive est moins développée, est considérée comme une solution de remplacement des animaux d'espèces supérieures comme sujets de recherches, le cas échéant. Par exemple, le nématode *Caenorhabditis elegans* est largement utilisé dans l'étude du fonctionnement neuronal de base parce que son système nerveux est doté de 302 neurones, permettant d'étudier la fonction de chacun des neurones et leurs interactions avec d'autres neurones. Les drosophiles ou mouches du vinaigre (*Drosophila melanogaster*), qui sont utilisées depuis plus de cent ans pour étudier la génétique, sont aussi utilisées pour étudier une large gamme de processus biologiques, notamment le développement, l'apprentissage, le

comportement et le vieillissement de l'embryon. Le remplacement des méthodes faisant appel à l'utilisation de rongeurs par des méthodes in vitro pour la production d'anticorps monoclonaux est une autre solution de remplacement en recherche.

Solutions de remplacement pour les épreuves d'innocuité et d'efficacité

Les organismes de réglementation exigent que les traitements vétérinaires et médicaux soient soumis à des essais d'innocuité et d'efficacité, ainsi que les produits communs comme les produits domestiques de nettoyage et les pesticides. Les préoccupations du public concernant l'usage des animaux dans ces essais, ainsi que les préoccupations concernant la pertinence des données sur les animaux, imposent un besoin de trouver des solutions de remplacement.

L'un des défis majeurs des promoteurs de solutions de remplacement pour les essais de nouvelles substances est de prouver que ces méthodes sont aussi efficaces que les essais chez les animaux qu'elles visent à remplacer. Deux organismes ont été créés afin de s'assurer de la validation scientifique appropriée des méthodes de rechange à l'utilisation des animaux pour les essais et de leur acceptation subséquente par des organismes de réglementation, soit le European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) en Italie et le Interagency Coordinating Committee for the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) aux États-Unis. Le Canada participe maintenant à la validation des solutions de remplacement par l'entremise du Canadian Centre for the Validation of Alternative Methods.

Bien que les organismes de réglementation du monde entier agissent avec prudence en ce qui a trait à l'acceptation de solutions de remplacement, des progrès continuent d'être faits. Le National Toxicology Program Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Methods des États-Unis fournit une liste des solutions estimées acceptables par les organismes de réglementations américaines et internationales.

Solutions de remplacement pour l'enseignement

Formation pratique

L'acquisition de compétences, que ce soit d'une simple technique comme la prise de sang ou d'une intervention chirurgicale élaborée comme la laparoscopie, est un élément important de la formation du personnel vétérinaire et médical. Les animaux sont toujours utilisés pour cette formation, mais certaines compétences comme les techniques de suture peuvent être apprises sans l'utilisation d'un animal vivant.

Solutions de rechange

Des modèles inanimés peuvent maintenant être utilisés pour pratiquer l'exécution des procédures. Par exemple, les étudiants peuvent pratiquer l'injection intraveineuse dans la queue du rat Koken, avant de pratiquer cette technique sur un animal vivant, et les chirurgiens peuvent utiliser des

mannequins et des technologies informatisées pour pratiquer la laparoscopie. Ces objets inanimés sont mieux acceptés pour la formation lorsque leurs propriétés sensorielles sont semblables à celles des organismes vivants.

Formation théorique

Depuis quelques années, l'adoption de solutions de remplacement a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés pour l'enseignement et la démonstration de principes biologiques.

Solutions de rechange

Il existe un large éventail de solutions de remplacement pour l'enseignement. Le matériel audiovisuel et les programmes d'ordinateur permettent à l'étudiant de visualiser les effets engendrés par la manipulation de divers organes. Plusieurs programmes d'ordinateur sont interactifs et permettent aux étudiants de participer aux expérimentations. Par exemple, un programme interactif pour l'anesthésie permet à l'étudiant d'évaluer la profondeur de l'anesthésie, de calculer la dose et de choisir la voie d'administration de divers anesthésiques.

Principes de la réduction

La recherche documentaire est vitale pour éviter la duplication inutile des expérimentations. La duplication de certaines études est nécessaire pour s'assurer de la reproductibilité des résultats obtenus par des chercheurs rattachés à d'autres laboratoires. Cependant, il n'est pas nécessaire de répéter les études à maintes reprises.

Les chercheurs disposent de plusieurs moyens qui peuvent aider à réduire le nombre d'animaux nécessaire à une étude, par exemple un bon plan d'expérimentation, un personnel qui a reçu la formation appropriée et prendre des mesures pour contrôler la variation.

Il est important de s'assurer que le nombre d'animaux utilisés est approprié, tant pour le groupe expérimental que pour le groupe témoin. Cela signifie que la conception statistique doit être soigneusement préparée avant le début de l'étude, et il peut être utile de consulter un statisticien. Un bon plan d'expérimentation comprenant des procédures appropriées de collecte et d'analyse de données permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Le raffinement des techniques d'analyse statistique permet aux chercheurs d'utiliser moins d'animaux sans perte considérable d'information.

Une équipe de recherche dont tous les membres, depuis le chercheur principal jusqu'aux techniciens de soin des animaux, ont reçu une formation adéquate assurera que toutes les procédures liées de près ou de loin à l'étude seront normalisées. Il est important que les membres de l'équipe reçoivent une formation dans leur spécialité et qu'une expertise supplémentaire soit incluse, au besoin. Par exemple, si le projet requiert une procédure chirurgicale particulière pour laquelle aucun membre

de l'équipe n'a reçu la formation appropriée, un chirurgien expérimenté devrait prêter son expertise. La formation pertinente à toutes les procédures à effectuer devrait être complétée avant le début du projet.

En ce qui a trait aux laboratoires d'enseignement qui font appel à des animaux, la qualité des séances de laboratoire est améliorée si des instructeurs qualifiés préparent les animaux plutôt que des étudiants sans formation.

La variation entraînée par des conditions expérimentales mal contrôlées justifie le besoin d'utiliser des groupes de grande taille dans les études faisant appel à des animaux. Par exemple, la taille du groupe peut être réduite si une population génétiquement homogène est utilisée, si les animaux sont protégés contre les maladies et si les conditions de soins et de gestion sont stables. Ceci est expliqué de manière plus détaillée sur le site Web de NC3Rs [en anglais seulement], dans la [section sur le plan d'expérimentation](#).

Modèles animaux ciblés

Dans le passé, il était difficile de trouver des modèles animaux qui simulaient adéquatement des conditions humaines comme plusieurs cancers. Il existait des modèles animaux pour le cancer du sein, mais la cause et le comportement biologique du cancer étaient différents de ceux chez l'humain. Les traitements appliqués aux modèles animaux n'étaient donc pas nécessairement applicables aux humains.

Solutions de rechange

L'identification d'animaux immunocompromis a permis la croissance de cellules d'origine humaine dans des animaux sans avoir recours à l'immunosuppression de l'hôte. Maintenant, le comportement et le traitement de la tumeur dans un modèle animal peuvent refléter la situation chez l'humain. Des modèles animaux ciblés avec autant de précision permettront de diminuer le nombre d'animaux utilisés en réduisant la variation du modèle et en augmentant l'utilité des résultats.

Les animaux génétiquement modifiés (transgéniques, knockouts et mutants) sont des solutions de remplacement prometteuses qui peuvent avoir des résultats plus pertinents lorsqu'il est question de mieux comprendre les maladies humaines. A priori, la réduction et le remplacement des animaux seront moindres parce que la production de colonies souches d'animaux génétiquement modifiés nécessite beaucoup d'animaux. Le raffinement des méthodes utilisées pour la création d'animaux génétiquement modifiés devrait entraîner d'importants progrès dans la compréhension et le traitement des maladies humaines tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés.

Principes du raffinement

Le raffinement est le plus subtil des Trois R sans doute parce qu'il produit des changements moins évidents dans le nombre d'animaux utilisés. Les solutions de raffinement ont des répercussions plus importantes sur la réduction de la douleur et de la détresse chez les animaux. L'utilisation appropriée d'anesthésiques, d'analgésiques et d'autres mesures thérapeutiques est un raffinement très important dans les études invasives. Le raffinement des soins et de la gestion, particulièrement la création d'environnements physiques et sociaux d'une complexité accrue, ont amélioré le bien-être des animaux d'expérimentation. L'établissement de points limites scientifiques appropriés aux diverses études (p. ex. l'évaluation des vaccins) a permis de diminuer la souffrance chez les animaux sans affecter la confiance dans les résultats.

Le raffinement des techniques joue également un rôle important tant pour la réduction que pour le remplacement des animaux en science, puisque les techniques raffinées entraînent moins de variations et améliorent les résultats obtenus. Par exemple, l'introduction d'anesthésiques nouveaux et plus sûrs et une meilleure formation des chercheurs quant à leur utilisation ont permis de réduire le nombre de mortalités liées à l'anesthésie.

Il existe plusieurs exemples de solutions de raffinement qui ont exercé une influence positive autant sur la vie des animaux que sur les résultats de recherche obtenus.

Soins et gestion

Dans le passé, les animaux d'expérimentation étaient hébergés seuls dans des cages ou des enclos avec très peu de surfaces de support ou d'espace pour leur permettre de se comporter normalement. La plupart des animaux d'expérimentation appartiennent à des espèces grégaires et l'isolement est pour eux un facteur de stress.

Solutions de rechange

La plupart des animaux peuvent être élevés dans des groupes sociaux et des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Nombre de rapports documentent les effets bénéfiques de ce type d'hébergement. Par exemple, les rats qui vivent dans un environnement social et physique complexe développent un cortex cérébral plus épais qui comporte plus de connexions dendritiques que celui des rats vivant en isolation. Les jeunes lapins hébergés dans de petites cages ont développé des anomalies squelettiques parce qu'ils ne pouvaient pas sauter et courir pendant la période de formation de leurs muscles et de leurs os.

Solutions de remplacement pour les techniques de prélèvement sanguin utilisées dans le passé

Le sinus rétro-orbital de certaines espèces de petite taille (les rongeurs en particulier) était un site opportun pour effectuer un prélèvement d'importantes quantités de sang. En plus d'être

douloureuse, cette procédure était risquée (p. ex. blessure à l'œil, particulièrement lors de prélèvements multiples). Plusieurs solutions de remplacement ont été conçues, notamment le prélèvement sanguin par ponction de la veine caudale, de la veine saphène et de la veine jugulaire. Même s'il faut avoir certaines compétences pour bien réussir ces procédures, le risque de blesser gravement l'animal est grandement réduit.

Expériences qui causent une souffrance grave ou la mort

Dans le passé, le point limite des animaux utilisés pour les essais de vaccins ou les études sur les maladies infectieuses, les tumeurs, les rejets d'organes ou d'autres études semblables, était parfois le décès causé par la maladie. Lorsqu'un animal est mourant, il cesse de manger et de boire, entraînant rapidement sa déshydratation. À peu d'exceptions près, il est possible de prévoir que la mort surviendra peu après le moment où l'animal cesse de manger et de boire.

Solutions de rechange

Lorsqu'il est prévu qu'une expérience provoquera une souffrance grave ou la mort, des points limites devraient être établis afin de limiter l'étendue de la souffrance et d'anticiper la mort. Si possible, des études pilotes devraient être effectuées afin de déterminer le point le plus précoce permettant d'obtenir des résultats scientifiques pour mettre fin à l'expérience avant que les animaux souffrent. Les études pilotes devraient au moins être utilisées pour déterminer quels signes cliniques peuvent mieux confirmer si le point limite a été atteint ou si la mort de l'animal est devenue inévitable.

Essais de toxicité

L'essai de la DL_{50} était exigé par les organismes de réglementation pour l'évaluation de la toxicité des nouveaux produits. DL_{50} est la dose qui tuerait 50 % des animaux soumis à l'épreuve. Beaucoup d'animaux ont été utilisés pour déterminer cette dose avec précision bien que sa pertinence en matière de toxicité chez l'humain ne soit pas établie.

Solutions de rechange

Un certain nombre de solutions de raffinement ont été conçues pour les épreuves de toxicité et ont été acceptées à titre de lignes directrices de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). Pour les essais de toxicité aiguë, la méthode de la dose prédéterminée (Ligne directrice 420), la méthode par classe de toxicité aiguë (Ligne directrice 423) et la méthode de l'ajustement des doses (Ligne directrice 425) ont maintenant été acceptées par les pays membres. L'essai de la DL_{50} (Ligne directrice 401) a été retiré et les organismes de réglementation des pays membres de l'OCDE doivent maintenant accepter les données obtenues avec l'une des solutions de remplacement. De plus, des recommandations publiées par la Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) décrivent comment utiliser les données d'expériences in vitro pour choisir la dose de départ de l'essai, réduisant davantage le nombre d'animaux nécessaires et améliorant la valeur prédictive des données.

Conclusion

Les Trois R guident l'utilisation éthique des animaux en science. Dans leur livre *Principles of Humane Experimental Technique*, les auteurs Russel et Burch proposent que tous les principes doivent être appliqués à tout programme d'étude, dans l'ordre, soit le remplacement, la réduction et le raffinement. Comme d'autres organismes nationaux responsables de l'éthique animale et des soins aux animaux en science, le CCPA exige le respect des Trois R, tel que stipulé dans la [Politique du CCPA : principes régissant la recherche sur les animaux](#) : « Des animaux ne devraient être utilisés que si le chercheur a tenté en vain, par tous les moyens possibles, de trouver une solution de rechange. Un partage constant des connaissances, une revue de la littérature et une adhésion à la règle Russell-Burch des Trois R (remplacement, réduction et raffinement) sont autant d'autres conditions nécessaires. Ceux qui utilisent des animaux doivent recourir aux méthodes les plus humaines, et ce, sur le plus petit nombre possible d'animaux appropriés requis pour obtenir des renseignements valables. »

La mise en application des Trois R a été confirmée en observant l'utilisation de méthodes de remplacement. Des progrès considérables ont été faits dans l'élaboration et la validation de méthodes qui ne font pas appel à des animaux, dans la mise en œuvre de bonnes techniques de planification expérimentale et d'analyse statistique, et dans l'amélioration des conditions d'hébergement et des procédures d'études faisant appel à des animaux. Le respect des Trois R est maintenant accepté comme une pratique scientifique fiable qui est bénéfique aux humains, aux animaux et à l'environnement, et qui améliore la qualité de vie des animaux utilisés dans les études.

Références

Balls M., Goldberg A.M., Fentem J.H., Broadhead C.L., Burch R.L., Festing M.F., Hendriksen C.F., Jennings M., van der Kamp M.D., Morton D.B., Rowan, A.N., Russell C., Russell W.M., Spielmann H., Stephens M.L., Stokes W.S., Straughan D.W., Yager J.D., Zurlo J. et van Zutphen B.F. (1995) The Three Rs: The way forward, ECVAM Workshop Report 11. *Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)* 23(6):838-866.

[Base de données Norina](#) (inventaire norvégien des solutions de rechange)

Rispin A., Farrar D., Margosches E., Gupta K., Stitzel K., Carr G., Greene M., Meyer W. et McCall D. (2002) Alternative methods for the median lethal dose (LD50) test: The up-and-down procedure for acute oral toxicity. *Institute for Laboratory Animal Research (ILAR)* 43(4):233-243.

Russell W.M.S. et Burch R.L. (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*. Londres R.-U. : Methuen. Édition spéciale, Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992.

Smyth D.H. (1978) *Alternatives to Animal Experiments*. Londres R.-U.: Sclar Press.

[The NC3Rs Experimental Design Assistant](#)