

ANNEXES CECCAPP

I-CLASSIFICATION DES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES SELON LEUR DEGRÉ DE GRAVITÉ

Le degré de gravité d'une procédure expérimentale est déterminé en fonction de l'intensité de la douleur, de la souffrance, de l'angoisse ou du dommage durable qu'un animal donné risque de subir au cours de la procédure expérimentale.

Les classes de gravité ci-dessous ainsi que les critères de classification sont extraits de l'annexe 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

Pour plus d'informations, consulter :

<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027038013&dateTexte=&categorieLien=id>

Classes de gravité

Sans réveil : Les procédures expérimentales menées intégralement sous anesthésie générale, au terme desquelles l'animal ne reprend pas conscience, relèvent de la classe « sans réveil ».

Légère : Les procédures expérimentales en raison desquelles les animaux sont susceptibles d'éprouver une douleur, une souffrance ou une angoisse légère de courte durée ainsi que celles sans incidence significative sur le bien-être ou l'état général des animaux relèvent de la classe « légère ».

Modérée : Les procédures expérimentales en raison desquelles les animaux sont susceptibles d'éprouver une douleur, une souffrance ou une angoisse modérée de courte durée ou une douleur, une souffrance ou une angoisse légère de longue durée ainsi que celles susceptibles d'avoir une incidence modérée sur le bien-être ou l'état général des animaux relèvent de la classe « modérée ».

Sévère : Les procédures expérimentales en raison desquelles les animaux sont susceptibles d'éprouver une douleur, une souffrance ou une angoisse intense ou une douleur, une souffrance ou une angoisse modérée de longue durée ainsi que celles susceptibles d'avoir une incidence grave sur le bien-être ou l'état général des animaux relèvent de la classe « sévère ».

Critères de classification

La détermination d'une classe de gravité tient compte de toute intervention ou manipulation concernant l'animal dans le cadre d'une procédure expérimentale donnée (type de manipulation, nature et intensité de la douleur, de la souffrance, de l'angoisse ou du dommage durable causé, durée, fréquence et multiplicité des techniques utilisées).

Cette classe de gravité est fondée sur les effets les plus graves que risque de subir l'animal après mise en œuvre de toutes les mesures de raffinement appropriées. D'autres facteurs additionnels sont également pris en compte :

- type d'espèce et du génotype ;
- stade de développement, âge et sexe de l'animal ;
- niveau d'apprentissage de la procédure expérimentale atteint par l'animal ;
- si l'animal est réutilisé, gravité réelle des procédures expérimentales antérieures ;
- méthodes utilisées pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse, y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins ;
- points limites adaptés.

Exemples non exhaustifs de différents types de procédures expérimentales définies selon chaque classe de gravité sur la base de facteurs liés au type de procédure expérimentale

1. Légère :

- a) Anesthésie, sauf si elle est exclusivement destinée à la mise à mort ;
- b) Etude pharmacocinétique ou traitement dans laquelle une dose unique est administrée, et la substance n'est pas censée avoir d'effet négatif détectable ;
- c) Prélèvement d'un nombre restreint d'échantillons sanguins avec un volume total prélevé < 10 % du volume sanguin de l'animal (soient au total <200µl/souris de 25g) (**voir Tab.2 ci-après**)
- d) Imagerie non invasive (par exemple: échographie, fluorescence 3D, chimiluminescence) avec sédation ou anesthésie appropriée ;
- e) Procédures expérimentales superficielles, par exemple biopsies de l'oreille et de la queue, implantation sous-cutanée non chirurgicale de pompes miniatures et transpondeurs ;
- f) Utilisation d'appareils externes de télémétrie (prise de température, test de glycémie, etc.) qui n'entraînent que des troubles mineurs chez l'animal ou qui n'ont qu'une incidence mineure sur son activité normale et son comportement normal ;
- g) Administration d'une substance par voie sous-cutanée, intramusculaire ou intrapéritonéale, par gavage et par voie intraveineuse via les vaisseaux sanguins superficiels, lorsque la substance n'a qu'une incidence légère sur l'animal et lorsque les volumes administrés sont dans des limites appropriées à la taille et à l'espèce de l'animal (**voir Tab. 3 ci-après**) ;
- h) Induction de tumeurs par injection de lignées tumorales ou tumeurs spontanées qui n'ont pas d'effet clinique négatif détectable (par exemple, tumeur sous-cutanée ou intramammaire non métastatique de taille <17mm en absence de nécrose et de gêne pour la locomotion de l'animal) ;
- i) Implantation chirurgicale sous cutanée sous anesthésie générale et analgésie appropriée de fragment de tumeur (modèle tumoral non métastatique) ;
- j) Elevage d'animaux génétiquement modifiés dans le but d'obtenir un phénotype ayant des effets légers (phénotype non dommageable) ;
- k) Régime alimentaire modifié qui ne répond pas à tous les besoins nutritionnels de l'animal et est susceptible d'entraîner une anomalie clinique légère pendant la période couverte par l'étude ;
- l) Jeûne forcé pendant moins de vingt-quatre heures chez la souris ou le rat adulte ;
- m) Etudes comportant, pendant une courte durée, la privation de congénères pour des espèces socialement développées et l'isolement en cage individuelle pour les rats ou les souris adultes.

2. Modérée :

- a) Application fréquente de substances d'essai produisant des effets cliniques modérés ;
- b) Prélèvements d'échantillons sanguins multiples avec période de récupération adaptée (**voir Tab. 1 ci-après** : pour une souris de 25g : 100µl/semaine ; 200µl/15 jours) ;
- c) Etudes de détermination des plages de concentrations présentant une toxicité aiguë, essais de toxicité chronique/de cancérogénicité, dont le point limite n'est pas la mort ;
- d) Chirurgie sous anesthésie générale et analgésie appropriée, associée à une douleur ou une souffrance postopératoire ou à un trouble de l'état général. Exemples : thoracotomie, craniotomie, laparotomie, orchidectomie, implantation de dispositifs biomédicaux (par exemple, émetteurs télémétriques, pompes miniatures, etc.) ;
- e) Modèles pour l'induction de tumeurs ou tumeurs spontanées susceptibles de causer une douleur ou une angoisse modérée ou d'avoir une incidence modérée sur le comportement normal (par exemple tumeur pulmonaire sans perte de poids>20%, en absence de difficulté respiratoire et en absence de signes de gêne et de douleur (poils hérissés, prostration) (**voir signes indicateurs de douleur ci-après**);
- f) Irradiation ou chimiothérapie avec une dose sublétales ou une dose normalement létale mais avec reconstitution du système immunitaire. Les effets négatifs escomptés devraient être légers ou modérés et de courte durée (< 5 jours) ;
- g) Elevage d'animaux génétiquement modifiés dans le but d'obtenir un phénotype dommageable ayant des effets modérés (tumeurs spontanées sous cutanées ou mammaires non métastatiques) ;
- h) Création d'animaux génétiquement modifiés par des procédures expérimentales chirurgicales ;

- i)* Etudes impliquant un régime alimentaire modifié qui ne répond pas à tous les besoins nutritionnels de l'animal et est susceptible d'entraîner une anomalie clinique modérée pendant la période couverte par l'étude ;
- j)* Jeûne forcé pendant quarante-huit heures chez la souris ou le rat adulte ;
- k)* Déclenchement de réactions de fuite ou d'évitement alors que l'animal n'est pas en mesure de s'échapper ou d'éviter le stimulus, susceptibles de causer une angoisse modérée.

3. Sévère :

- a)* Essais de toxicité dont le point limite est la mort ou susceptibles d'entraîner la mort et de causer des états pathologiques graves. Par exemple, essai de toxicité aiguë au moyen d'une dose unique (voir OCDE, lignes directrices pour les essais) ;
- b)* Essai d'activité d'un vaccin caractérisé par un trouble persistant de l'état général de l'animal, une maladie progressive mortelle, associés à une douleur, une angoisse ou une souffrance modérée de longue durée ;
- c)* Irradiation ou chimiothérapie avec une dose létale sans reconstitution du système immunitaire ou avec reconstitution et déclenchement d'une maladie induite par le rejet de la greffe ;
- d)* Modèles avec induction de tumeurs ou avec tumeurs spontanées susceptibles de provoquer une maladie progressive mortelle associée à une douleur, une angoisse ou une souffrance modérée de longue durée. Par exemple: tumeurs invasives et métastatiques (osseuse, pulmonaire, intracérébrale, hépatique, pancréatique, du colon) entraînant une cachexie (>20% de perte de poids), une difficulté respiratoire, des troubles du comportement (difficulté de locomotion, absence de toilettage, prostration), développement d'ascite ;
- e)* Interventions chirurgicales ou autres sous anesthésie générale, susceptibles de causer une douleur, une souffrance ou une angoisse postopératoire intense ou modérée et persistante et un trouble persistant de l'état général de l'animal. Fractures instables provoquées, thoracotomie sans analgésie appropriée ou traumatisme visant à entraîner une défaillance multiple d'organes ;
- f)* Elevage d'animaux atteints de troubles génétiques, susceptibles de présenter un trouble grave et persistant de l'état général, par exemple, maladie de Huntington, dystrophie musculaire, névrite chronique récurrente (phénotype dommageable ayant des effets sévères) ;
- g)* Test de la nage forcée ou de l'exercice forcé dont le point limite est l'épuisement.

II-Signes indicatifs de gêne ou de douleur :

- **Activité/comportement :**
 - . Réduction des activités alimentaires et de toilettage
 - . Anomalie du cycle veille/sommeil
 - . Immobilité, prostration, apathie, agitation, agressivité
 - . Léchage/auto-mutilation de la région douloureuse
 - . Vocalisations inhabituelles
- **Modifications motrices ou de posture :**
 - . Boitement, retrait d'un membre
- **Modifications physiques :**
 - . Perte de poids, chute du pelage, température
- **Modifications végétatives :**
 - . Tachycardie ; halètement, dyspnée ;
 - . Jetage, salivation ; dilatation de la pupille

III-Bonnes pratiques en expérimentation animale

1. Volumes maximaux et période de récupération (Tab.1)

Prélèvement unique		Prélèvements multiples	
% du volume circulatoire retiré	Période de récupération approximative	% du volume circulatoire retiré sur 24 heures	Période de récupération approximative
7.5%	1 semaine	7.5%	1 semaine
10%	2 semaines	10-15%	2 semaines
15%	4 semaines	20%	3 semaines

2. Volumes sanguin total et d'échantillon selon les espèces pour un poids donné (Tab.2)

Espèces(poids)	Volume sanguin total (ml)	7.5% (ml)	10% (ml)	15% (ml)	20% (ml)
Souris (25 g)	1.8	0.1	0.2	0.3	0.4
Rat (250 g)	16	1.2	1.6	2.4	3.2
Lapin (4 kg)	224	17	22	34	45

Référence : Diehl K-H *et al.*, A Good Practice Guide to the administration of Substances and Removal of blood, Including Routes and Volumes, J. of Applied Toxicology, 21, 15-23 (2001).

3. Volumes d'administration (Tab.3)

Espèces (poids)	Voie et volumes (volume max. toléré)						
	orale	Sous-cutanée	intra-péritonéale	Intra-musculaire	Intraveineuse (bolus)	Intraveineuse (infusion lente)	Intradermique
Souris (25 g)	250 µl (1.25 ml)	250µl (1 ml)	500 µl (2 ml)	50 µl (100 µl)	125 µl	(625 µl)	50 µl
Rat (250g)	2.5 ml (10 ml)	1.25 ml (2.5 ml)	2.5 ml (5 ml)	100 µl (200µl)	1.25 ml	5 ml	50 µl
Lapin (4 Kg)	40 ml (60 ml)	4 ml (8 ml)	20 ml (80 ml)	1 ml (2 ml)	8 ml	40 ml	100 µl

Référence : Diehl K-H *et al.*, A Good Practice Guide to the administration of Substances and Removal of blood, Including Routes and Volumes, J. of Applied Toxicology, 21, 15-23 (2001).

4. Points limites

Un point limite désigne un état de santé de l'animal d'expérience qui n'est plus compatible avec la poursuite du protocole (pour raison scientifique, éthique ou autre).

Il est demandé à l'expérimentateur de définir les critères cliniques qui seront pris en compte pour décider d'exclure un animal de l'étude (durant l'expérimentation et lors de ses suites).

Pour plus d'informations, consulter :

http://www.ccac.ca/fr_/normes/lignes_directrices

IV- Les méthodes d'anesthésie et de mise à mort disponibles dans les différents établissements du CECCAPP (Tab.4)

Etablissement	Zone	Méthodes d'anesthésie disponibles	Méthodes d'analgésie disponibles (concentration recommandée)	Méthodes d'euthanasie disponibles
AniCan	1, 2, 3, 4, 5	<ul style="list-style-type: none"> • Kétamine/Xylazine (2/1) • Isoflurane 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Doliprane 2%</u> • <u>Emla crème 5%</u> • <u>Morphiniques</u> 	CO2 Dislocation cervicale
	A1	<ul style="list-style-type: none"> • Kétamine/Xylazine (2/1) • Isoflurane • Anesthésiques locaux : • Lurocaïne 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Metacam</u> • <u>Doliprane 2%</u> • <u>Morphiniques</u> 	CO2 Dislocation cervicale Surdose anesthésique (pentobarbital)
PBES	A2	<ul style="list-style-type: none"> • Kétamine/Xylazine (2/1) • Lurocaïne (Anesthésique local) 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Metacam</u> • <u>Doliprane 2%</u> • <u>Morphiniques</u> 	Dislocation cervicale Surdose anesthésique (pentobarbital)
	A3	<ul style="list-style-type: none"> • Kétamine/Xylazine (2/1) • Lurocaïne (Anesthésique local) 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Metacam</u> • <u>Doliprane 2%</u> • <u>Morphiniques</u> 	Dislocation cervicale Surdose anesthésique (pentobarbital)