



Commission
européenne

Respecter les animaux pour la science de demain

DIRECTIVE 2010/63/UE
SUR LA PROTECTION DES ANIMAUX
UTILISÉS À DES FINS SCIENTIFIQUES



**CADRE D'ÉVALUATION DE LA
GRAVITÉ DES PROCÉDURES**

Ni la Commission européenne ni aucune personne agissant au nom de la Commission n'est responsable de l'usage qui pourrait être fait des informations données ci-après.

Luxembourg: Office des publications de l'Union européenne, 2018

© Union européenne, 2018

Réutilisation autorisée, moyennant mention de la source

La politique de réutilisation des documents de la Commission européenne est régie par la décision 2011/833/UE (JO L 330 du 14.12.2011, p. 39).

Toute utilisation ou reproduction de photos ou d'autres documents dont l'Union européenne n'est pas titulaire des droits d'auteur est interdite sans l'autorisation des titulaires des droits d'auteur.

Print ISBN 978-92-79-80557-8 doi:10.2779/326830 KH-01-18-213-FR-C

PDF ISBN 978-92-79-80588-2 doi:10.2779/183771 KH-01-18-213-FR-N

Table des matières

Document de travail en vue de l'établissement d'un cadre d'évaluation de la gravité des procédures	1 – 21
Illustration des procédures de classification de la gravité, d'évaluation journalière et d'appréciation de la gravité réelle à l'aide d'exemples p.	23 - 94

**Autorités nationales compétentes pour la mise en œuvre de la
directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins
scientifiques**

**Document de travail en vue de l'établissement d'un cadre d'évaluation de
la gravité des procédures**

Bruxelles, les 11 et 12 juillet 2012

La Commission a mis sur pied un groupe d'experts chargé d'évaluer la gravité des procédures en vue de faciliter la mise en œuvre de la directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Tous les États membres ont été invités à désigner des experts, au même titre que les principales organisations concernées.

Le groupe d'experts pour l'évaluation de la gravité des procédures s'est réuni à deux reprises: en décembre 2011, pour traiter de la question des animaux génétiquement modifiés, et en mai 2012, pour débattre d'un cadre général d'évaluation de la gravité des procédures pour les animaux.

Le présent document est le fruit des travaux de ces deux réunions du groupe d'experts, de discussions menées avec les États membres ainsi que des éclaircissements juridiques apportés par la Commission quant au cadre d'évaluation de la gravité, à ses composantes, à ses participants, aux méthodes employées et aux outils de travail. Il a été approuvé par les autorités nationales compétentes pour la mise en œuvre de la directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques lors de leur réunion des 11 et 12 juillet 2012.

Clause de non-responsabilité:

Les pages qui suivent ont pour vocation d'aider les États membres et autres instances concernées par cette directive à s'entendre sur le sens à donner aux dispositions de la directive. Toutes les remarques doivent être examinées dans le contexte de la directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Seule la Cour de Justice de l'Union européenne est habilitée à interpréter le droit européen avec force de loi.

Table des matières

Articles connexes de la directive 2010/63/UE.....	3
Contexte général	3
Considérations générales pour une évaluation de la gravité	4
Considérations pré-étude	6
Indicateurs de gravité.....	6
<i>Catégories transversales</i>	7
<i>Facteurs à prendre en compte dans l'évaluation de la gravité réelle</i>	8
Comment garantir la cohérence de l'évaluation et de la répartition en classes de gravité réelle	10
<i>Élaboration d'une fiche d'évaluation propre à la procédure</i>	11
<i>Cohérence dans l'évaluation de la gravité réelle</i>	11
Qui devrait fournir des informations en vue de l'évaluation de la gravité réelle?.....	13
Outils de suivi, médias et autres considérations	13
Annexe I	15
Glossaire des observations cliniques	15
Annexe II	18
Ouvrages de référence, lignes directrices et ressources en ligne concernant l'évaluation du bien-être des animaux soumis à des procédures scientifiques	18

Articles connexes de la directive 2010/63/UE

- **Article 4, paragraphe 3:** *«Les États membres veillent au raffinement des conditions d'élevage, d'hébergement et de soins, et des méthodes utilisées dans les procédures, afin d'éliminer ou de réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse ou tout dommage durable susceptible d'être infligé aux animaux.»*
- **Article 15, paragraphe 1^{er}:** *«Les États membres veillent à ce que toutes les procédures soient réparties, cas par cas, en classe "sans réveil", "légère", "modérée" ou "sévère" sur la base des critères de classification énoncés à l'annexe VIII.»*
- **Article 16, paragraphe 1^{er}, point d):** *«la procédure est conforme à l'avis vétérinaire, en prenant en considération le sort de l'animal concerné sur toute sa durée de vie.»*
- **Article 54, paragraphe 2:** *«Les États membres collectent et publient chaque année des informations statistiques sur l'utilisation d'animaux dans des procédures, y compris des informations sur la gravité réelle des procédures et sur l'origine et les espèces des primates non humains utilisés dans des procédures.»*

Contexte général

La directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques exige que la gravité de chacune des procédures d'un projet fasse l'objet d'une évaluation prospective (article 15), en vue de classer celles-ci suivant leur degré de gravité («sans réveil», «légère», «modérée» ou «sévère»). L'annexe VIII fournit des indications sur les facteurs à prendre en compte lors de la détermination de la gravité attendue des procédures et propose quelques exemples pour chaque classe de gravité.

L'article 54, consacré aux rapports, exige que des informations statistiques sur l'intensité réelle de la douleur, de la souffrance, de l'angoisse ou du dommage durable subis par l'animal soient collectées (par opposition à l'évaluation prospective, ou prévisionnelle, de la gravité réalisée au moment de l'examen du projet). Par ailleurs, la gravité réelle des éventuelles procédures auxquelles l'animal a été soumis précédemment sera prise en compte dans la décision de réutiliser ou non celui-ci dans d'autres procédures (article 16).

Ces mesures permettront d'améliorer la qualité de la recherche scientifique et le bien-être des animaux grâce à l'évaluation prospective des propositions de projets et, par la prise en compte de la souffrance réelle subie par l'animal, garantiront une plus grande transparence et une meilleure compréhension de l'impact des procédures scientifiques sur le bien-être animal.

Parmi les principaux avantages de l'évaluation prospective, du suivi ainsi que de l'évaluation et de la consignation de la gravité réelle des procédures, citons:

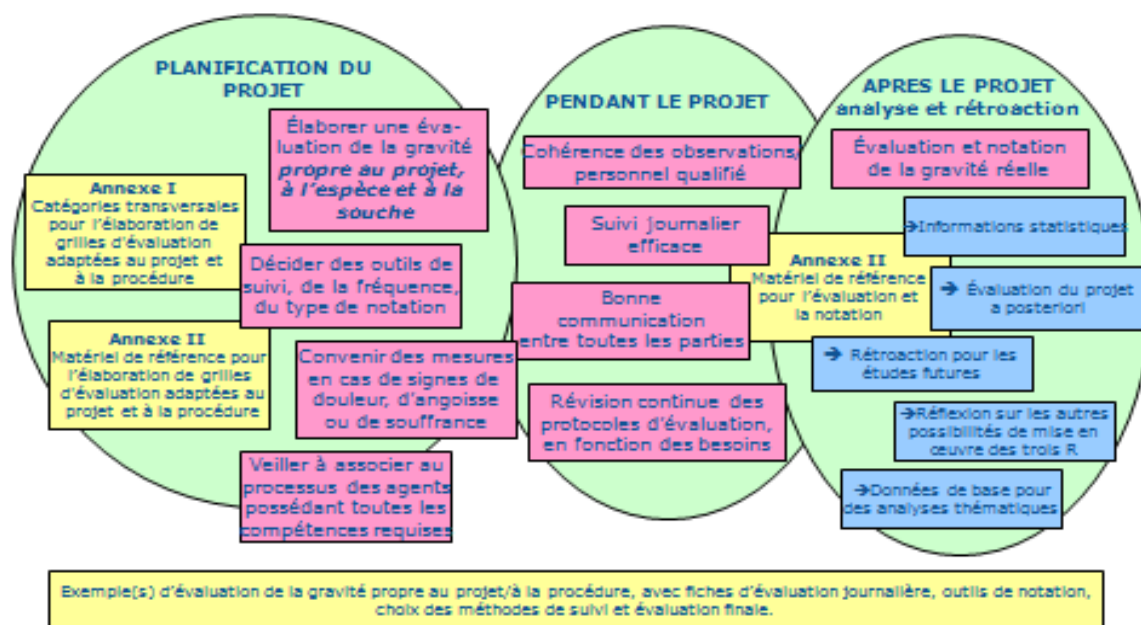
- la possibilité, entre autres, de raffiner les procédures et de réduire la souffrance des animaux; il devrait néanmoins être généralement possible, dès les discussions prospectives, de déterminer si une expérimentation animale est réellement nécessaire (remplacement) et si la manière dont l'étude a été conçue permet de réduire au maximum le recours à des animaux (réduction);

- un renforcement du bien-être animal, notamment si les souffrances sont mises en évidence et soulagées plus tôt;
- une transparence accrue, étant donné que les statistiques devraient mieux refléter le tribut réel payé par les animaux;
- une meilleure communication entre les personnes chargées d'utiliser les animaux, d'en prendre soin et de les suivre;
- la mise à disposition d'informations pour l'évaluation ex-post des projets lorsque celle-ci sera effectuée (article 39);
- une amélioration de la qualité des données scientifiques, grâce à un meilleur bien-être;
- de meilleures connaissances dans le domaine de l'évaluation de la gravité et des signes cliniques, qui favoriseront une plus grande cohérence dans les évaluations – pour autant que les méthodes et résultats soient diffusés, par exemple par l'intermédiaire de revues, de groupes de discussion et de réunions;
- l'apport d'informations nouvelles dans la formation des chercheurs, ainsi que des techniciens et vétérinaires préposés aux animaux de laboratoire, si les résultats sont utilisés à titre d'exemples;
- des informations fondées qui pourront être utilisées dans les évaluations dommages-avantages prospectives de futurs projets analogues.

Considérations générales pour une évaluation de la gravité

L'examen de la gravité d'une procédure devrait être un **processus continu**, qui commence avec la conception initiale de l'étude, passe par le suivi spécifique, au jour le jour, des animaux tout au long du projet et se termine par l'évaluation de la gravité «réelle» des procédures au terme de l'étude, laquelle permettra de recenser les raffinements possibles à l'avenir.

ÉVALUATION DE LA GRAVITÉ – UN PROCESSUS CONTINU



Cette méthode permet de mieux veiller à la prise en compte et à la mise en œuvre des trois R tout au long du projet, d'améliorer la communication entre les différentes parties et de renforcer la cohérence.

L'évaluation de la gravité réelle exige

- **une démarche d'«équipe»**, faisant intervenir des personnes dotées d'une expertise, d'une expérience et de priorités différentes (chercheurs, techniciens et personnel préposés aux animaux, vétérinaire);
- une bonne planification;
- une formation continue adéquate de tout le personnel concerné;
- des systèmes d'évaluation de la gravité au jour le jour, conçus en fonction des espèces, des souches et du projet, comprenant notamment des observations avisées et structurées des animaux à des intervalles appropriés (p. ex. avec une fréquence accrue pendant et après les procédures);
- des protocoles efficaces et bien étayés pour l'évaluation du comportement et des signes cliniques;
- une analyse des observations, de manière à pouvoir poser un jugement éclairé sur la nature et l'intensité de la souffrance;
- une bonne connaissance de la gravité de chaque procédure et des mesures à prendre si celle-ci est atteinte ou dépassée;
- une approche cohérente des évaluations globales en matière de souffrance réelle (légère, modérée, sévère) en vue d'établir des rapports statistiques;

- une réflexion quant à la manière dont les trois R ont été mis en œuvre et aux améliorations éventuelles qui pourraient être apportées pour les futures études.

Considérations pré-étude

C'est dès la **phase de conception de l'étude**, lorsque l'on examine s'il est ou non nécessaire et justifié d'avoir recours à des animaux vivants pour atteindre les objectifs scientifiques visés, qu'il faut s'assurer de réduire au minimum la gravité des procédures scientifiques.

- Si le recours à des animaux vivants est nécessaire et justifié, il importe de veiller à choisir un modèle approprié et à concevoir une étude solide.
- Tous les aspects de l'étude susceptibles de provoquer douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables doivent être recensés, et il convient d'examiner les possibilités d'en réduire les effets, par exemple en compulsant la littérature disponible ou en consultant collègues, techniciens préposés aux animaux, vétérinaires et, le cas échéant, le Comité de bien-être animal.
- La classification prospective recommandée des procédures dans les classes de gravité doit se fonder sur la gravité la plus élevée attendue pour tout animal participant à l'étude.
- Un plan d'observation des animaux adéquat et conçu sur mesure pour l'étude doit être élaboré. Une terminologie harmonisée, compréhensible par toutes les parties prenantes à l'étude, renforcera la cohérence des rapports et de leur interprétation.
- Il importe de s'assurer que les effectifs de personnel qualifié et compétent disponibles pour réaliser l'étude, assurer le suivi des animaux et prendre soin d'eux soient suffisants.

Indicateurs de gravité

Certains comportements et signes cliniques peuvent servir à évaluer la gravité des procédures «côté cage» (aquarium, enclos, etc.). La terminologie utilisée pour les décrire doit être compréhensible par toutes les parties qui participent à l'utilisation des animaux, à leur suivi et à leur entretien. Avant d'élaborer ou d'appliquer un quelconque système d'évaluation de la gravité, il est capital de bien connaître l'état de santé, les comportements et le bien-être normaux de l'espèce (ou de la souche, le cas échéant).

Le but devrait être:

- d'offrir à l'animal la meilleure qualité de vie possible;
- de garantir que toute souffrance due aux procédures scientifiques sera détectée et
- réduite,

tout en restant cohérent avec les objectifs scientifiques poursuivis.

Tout système d'évaluation devrait efficacement détecter les écarts par rapport à un état de santé et de bien-être normal, et permettre à l'observateur de consigner et de fournir une évaluation claire et cohérente de chaque animal.

Une démarche simple, hiérarchisée, peut être utilisée afin de définir un protocole d'évaluation de la gravité adapté à l'espèce, à la souche, aux individus et à la procédure. Ce processus devrait recenser tous les effets néfastes susceptibles de se produire tout au long de la vie de l'animal, notamment dans le cadre de son hébergement, de son élevage, des soins qui lui sont donnés et de sa manipulation, ainsi que les effets liés aux procédures scientifiques et à leurs conséquences. L'examen de toutes ces données devrait permettre de dégager des indicateurs à utiliser pour évaluer efficacement le bien-être de l'animal côté cage. Ces indicateurs doivent tenir compte de l'espèce, de la souche et des procédures expérimentales appliquées. Ils doivent aussi être faciles à comprendre, à apprécier et à consigner de manière cohérente. Il doit néanmoins aussi être possible de mettre en évidence et de consigner, par exemple sous la forme d'un texte libre, tout effet négatif inattendu.

Critères transversaux

Un ensemble de critères «transversaux», s'appliquant à toutes les espèces, sont répertoriés ci-après. Ceux-ci peuvent servir de point de départ pour dresser une liste complète d'indicateurs spécifiques pour chaque procédure ou programme de soins. Le but de cette démarche consiste à recenser un nombre suffisant d'indicateurs propres à l'étude de manière à éviter que des signes de souffrance ne passent inaperçus, sans pour autant mettre en place un système exagérément complexe qui serait inutilement bureaucratique et chronophage.

Ces critères transversaux sont les suivantes:

- Aspect
- Fonctions corporelles
- Environnement
- Comportements
- Indicateurs spécifiques de la procédure
- Observations libres (autres observations pertinentes)

Les indicateurs de chacune de ces catégories peuvent être adaptés à toutes les espèces. Ils devraient être utilisés pour établir une liste de caractéristiques observables qui puissent être évaluées par un agent adéquatement formé afin de poser un jugement sur l'état de santé et de bien-être général de l'animal.

Ces indicateurs devraient être étudiés et sélectionnés en concertation avec la ou les personnes responsables de la supervision du bien-être des animaux et, le cas échéant, avec le Comité de bien-être animal. Ils devraient ensuite être utilisés pour élaborer un système de documentation côté cage spécifique de l'étude, pour les observations, le suivi et l'évaluation journaliers.

L'annexe I fournit un exemple de la manière dont ces critères transversaux peuvent être subdivisées et utilisées pour élaborer des critères d'observation adéquats, faisant appel à une terminologie descriptive commune.

L'annexe II fournit des informations sur les lignes directrices et la bibliographie en ligne susceptibles de faciliter l'élaboration d'une évaluation appropriée du bien-être des animaux soumis à des procédures scientifiques.

Facteurs à prendre en compte dans l'évaluation de la gravité réelle

On notera que, suivant la situation en présence, certains éléments peuvent avoir un impact positif ou négatif sur la gravité, et qu'il importe de ne pas négliger les différences entre espèces.

L'évaluation de la gravité réelle devrait être réalisée sur une base individuelle, au cas par cas, en fonction des observations faites sur les animaux dans le cadre du suivi journalier. Des paramètres supplémentaires, nécessaires aux fins de l'étude, peuvent aussi être utilisés le cas échéant. Ainsi, des indicateurs non visuels (comme la température corporelle, le poids corporel, des paramètres biochimiques ou des données de biotélémetrie comme le rythme cardiaque) peuvent également être requis dans le cadre de l'étude et devraient être pris en compte dans l'évaluation de la gravité s'ils peuvent apporter un complément d'information.

La gravité réelle à consigner pour chaque animal doit correspondre au degré de gravité le plus élevé rencontré au cours de la procédure et ne doit pas être déterminée par la gravité en fin de procédure. De même, l'évaluation ne doit pas être considérée comme un simple processus cumulatif, p. ex. plusieurs procédures de gravité légère = gravité modérée. Elle doit s'appuyer sur une analyse globale de l'expérience de l'animal du début à la fin de la procédure.

La liste ci-dessous propose quelques exemples du type d'éléments à prendre en compte et à pondérer lorsque l'on évalue la gravité réelle.

Procédure, technique

- chirurgicale/non chirurgicale;
- niveau et durée de la contrainte;
- absence de produits analgésiques/anesthésiants quand au moins l'un de ces deux types de produits ne serait pas nécessaire;
- nouveau modèle ou nouvelle procédure;
- éléments environnementaux (hébergement, restrictions en matière d'alimentation/d'eau, etc.);
- stress/angoisse;
- procédures répétées et intervalles entre celles-ci (nécessité aussi d'examiner la fréquence et la combinaison d'interventions «en-deçà du seuil»);
- réutilisation ou poursuite de l'utilisation.

Espèces, souches, stade de développement, expérience antérieure

- **Il s'agit d'un aspect essentiel à prendre en considération – il est nécessaire de comprendre la biologie et le comportement des espèces et souches (et parfois des individus) pour être en mesure de prédire et d'évaluer la gravité efficacement;**
- **espèces et souches;**
- origine de l'animal, p. ex. élevé à des fins de recherche, sauvage;
- provenance (y compris conditions d'hébergement antérieures) et transport;
- génotype, phénotype, sexe, âge, statut immunitaire;
- comportement naturel et biologie (p. ex. importance relative des différents sens, comme la vue pour les primates ou l'odorat pour les rongeurs, et impact de l'environnement du laboratoire sur ceux-ci);
- hébergement individuel/groupé – justification pour héberger individuellement des animaux sociaux ou les séparer de groupes établis à court ou à long terme;
- rythmes diurnes, p. ex. impact de la réalisation de procédures scientifiques ou d'élevage sur des animaux nocturnes en pleine journée;
- séparation maternelle chez toutes les espèces, y compris les rongeurs;
- aptitudes cognitives, conscience, mémoire, perception des effets des procédures.

Fréquence, intensité

- Il n'existe aucun lien direct entre fréquence et gravité, p. ex. une fréquence accrue ne résulte pas nécessairement dans une gravité plus grande. En effet, l'impact de la répétition de procédures ou des techniques sur la gravité dépend de plusieurs facteurs, dont l'intensité de chaque intervention, sa durée, l'espèce utilisée et l'expérience de l'individu.
- Lorsque des interventions sont répétées, il existe un potentiel d'acclimatation qui peut réduire la gravité. C'est notamment le cas chez les primates non humains soumis à des procédures légères. A l'inverse, la répétition peut également accroître la gravité, par exemple parce que l'animal anticipe une procédure stressante ou souffre d'hyperalgésie en cas de chirurgie.
- Possibilité d'un entraînement par motivation positive, ou «récompenses» après les procédures.
- C'est le degré de gravité le plus élevé qui doit être enregistré, et non le «taux de récupération».

Durée de l'effet

- La durée est liée à l'intensité (et donc à la gravité);
- Possibilité d'utiliser des points-limites précoces.

Efficacité des raffinements

- Analgésiques, anesthésiants et soins postopératoires appropriés;
- Enrichissement – enrichissement environnemental et hébergement groupé des animaux sociaux;
- Hébergement, élevage et soins – s’il est possible de raffiner ceux-ci en fonction des meilleures pratiques actuelles ou si la procédure nécessite des restrictions telles qu’un confinement dans des enclos plus petits (p. ex. cages de métabolisme), des caillebotis ou une exposition environnementale susceptible d’engendrer du stress;
- Former l’animal à coopérer ou faciliter son acclimatation aux procédures;
- Efficacité des protocoles d’évaluation au niveau des cages.

Gravité cumulative

- L’expérience de chaque animal tout au long de sa vie, au cours de laquelle la gravité peut être influencée par des restrictions quant aux possibilités d’amélioration de l’hébergement ou par la nécessité de captures, des manipulations et des contraintes fréquentes, etc., doit être prise en compte dans une procédure regroupant plusieurs étapes et interventions.
- Procédures antérieures dans le cas d’une réutilisation
- L’expérience de l’animal au cours de sa vie, qui inclut des éléments tels que la provenance (p. ex. sevrage précoce) et le transport, doit être prise en compte lorsqu’une réutilisation est envisagée.

Comment garantir la cohérence de l'évaluation et de la répartition en classes de gravité réelle

La participation des scientifiques concernés, des techniciens attachés aux animaux, de vétérinaires et du personnel chargé de prendre soin des animaux dès la phase de conception de l’étude est généralement requise afin de s’assurer de disposer des données adéquates pour décider, en connaissance de cause, de la gravité réelle à la fin de procédure. L’attribution finale d’une classe de gravité réelle sera le fruit de l’analyse des observations relatives aux comportements, aux signes cliniques et aux autres paramètres pertinents enregistrés au niveau des cages.

Parmi les éléments qui contribuent à la cohérence, citons:

- La prise en compte d’expériences, expertises et priorités multiples – démarche «d’équipe»;
- la formation à l’utilisation du protocole d’évaluation journalier (y compris la terminologie commune utilisée pour décrire les observations);
- l’expertise en matière de santé, de bien-être et de comportement animaux;
- un examen régulier des résultats;

- une communication entre toutes les personnes responsables de la réalisation de l'étude et du suivi des animaux (de haut en bas, de bas en haut, entre équipes et au sein des équipes);
- une supervision (locale (p. ex. Comité de bien-être animal), régionale, nationale, européenne).

Les points clés suivants devraient être pris en considération afin de garantir la cohérence de l'évaluation de la gravité réelle:

Élaboration d'une fiche d'évaluation propre à la procédure

- Des fiches d'évaluation adaptées aux espèces, souches et études devraient être élaborées et faire l'objet d'un accord avant le démarrage du projet.
- Toutes les informations pertinentes disponibles devraient être utilisées efficacement en vue d'élaborer des fiches d'évaluation propres à l'étude (expérience antérieure, résultats d'études *in vitro* ou *in silico*, recherches dans la littérature, informations issues d'études pilotes et signes cliniques observés chez les humains ou d'autres animaux, par exemple).
- Les informations sur les paramètres à observer et les instructions relatives au suivi devraient être conservées à proximité des cages.
- La classe de gravité attendue «dictera» en partie le niveau d'intervention requis sur le plan opérationnel, et déterminera notamment la nécessité d'une démarche d'équipe pour le suivi, ainsi que les personnes qui devraient être associées aux observations à proprement parler et au processus d'enregistrement. Les auteurs du protocole d'évaluation propre à l'étude devraient se charger de déterminer la classe de gravité finale et/ou la confirmer.
- Suivant la complexité de l'étude, des fiches d'évaluation distinctes pour les différents composants peuvent se révéler utiles (p. ex. fiche standard de soins opératoires/péri-opératoires utilisée en combinaison avec un protocole d'évaluation de l'étude sur mesure).
- Dans certains cas, il sera judicieux d'inclure, dans les fiches d'évaluation propres à l'étude, des informations relatives à la gestion des colonies, p. ex. données relatives à la croissance et à la reproduction d'animaux génétiquement modifiés.

Cohérence dans l'évaluation de la gravité réelle

La gravité réelle est évaluée en fin de procédure. À ce stade, une décision doit être prise concernant la gravité réelle globale subie par l'animal, sur la base des évaluations journalières et en tenant compte des procédures effectuées.

- Une méthode courante consiste à définir des niveaux «léger», «modéré» et «sévère» pour chacun des indicateurs utilisés dans les évaluations journalières, puis à décider de la gravité de ceux-ci au cas par cas.
- **Comme dans le cas du suivi journalier, il est essentiel que les critères d'évaluation de la gravité réelle soient adaptés à la procédure, à l'espèce et à la souche.** Ainsi, une perte de 10 % de la masse corporelle aura des répercussions très différentes pour la santé et le bien-être d'un jeune rat en pleine croissance, d'une souris adulte porteuse d'une tumeur à croissance rapide ou d'un chien adulte.
- Il est également essentiel de prendre en compte la période sur laquelle certains de ces indicateurs se manifestent, surtout eu égard aux pertes de poids et à la consommation d'eau/de nourriture.

L'évaluation sera réalisée sur la base des évaluations journalières enregistrées, en tenant compte de la procédure effectuée sur l'animal, de la durée des effets néfastes et de la réutilisation ou non de l'animal. Bien que cette méthode comporte inévitablement une part de subjectivité, une bonne formation de l'observateur devrait permettre de réduire celle-ci.

Détermination de la classe de gravité réelle lorsque des animaux sont trouvés morts

- Si un animal est trouvé mort, en d'autres termes s'il n'a pas été euthanasié, cela peut être une conséquence de la procédure expérimentale ou être dû à une toute autre cause¹;
- La classe de gravité réelle pour les animaux trouvés morts doit être «sévère», à moins qu'il soit possible d'exclure, en connaissance de cause, que l'animal ait subi des souffrances graves avant sa mort;
- S'il est peu probable que le décès ait été précédé de souffrances graves, la classe de gravité réelle devra refléter l'expérience connue avant le décès. Des facteurs tels que la fréquence du suivi, le recours à des analgésiques, etc., devront être dûment pris en compte.
- Seul un animal vivant peut subir des «dommages (durables)».

Des exemples permettant d'illustrer la répartition en classes de gravité, l'évaluation journalière et l'évaluation finale de la gravité réelle devraient être mis au point et proposés à la communauté scientifique.

¹ Aux fins de l'établissement de statistiques, la gravité réelle devrait être principalement corrélée à la gravité des procédures expérimentales et non à des incidents sans lien avec celles-ci, comme une épidémie ou une inondation. Ces types d'incidents ont trait à des problèmes de santé ou aux pratiques d'élevage et d'entretien, et non à des dommages causés par les procédures. Il convient néanmoins de les consigner, de les examiner et d'en assurer le suivi afin qu'ils ne se reproduisent pas.

Qui devrait fournir des informations en vue de l'évaluation de la gravité réelle?

- L'observation et l'enregistrement des effets sont souvent des processus distincts de la détermination de la classe de gravité à proprement parler.
- Des responsabilités claires doivent être définies afin de garantir un suivi journalier efficace des animaux, avec un soutien et une supervision adéquats.
- Un processus de vérification doit être mis en place en vue de favoriser la cohérence, p. ex. en comparant les notes des évaluations réalisées par différentes personnes.
- Les rôles relatifs à l'observation et au suivi des animaux ainsi qu'à la réalisation des évaluations de gravité à proprement parler doivent être souples et ajustables selon la complexité et la gravité de l'étude concernée – quoique la personne mentionnée dans l'autorisation du projet reste juridiquement responsable des efforts mis en place pour déceler et réduire la souffrance.
- Les comités de bien-être animal devraient aussi jouer un rôle, au niveau de l'établissement, en vue de garantir la cohérence.
- Les comités nationaux et les autorités compétentes peuvent également contribuer à renforcer la cohérence.

Outils de suivi, communication et autres considérations

- Le recours à des grilles d'évaluation devrait être envisagé dès la phase de planification du projet.
- Ces grilles d'évaluation doivent être aussi simples que possible, mais comporter le degré de détail requis et être adaptées au type d'étude.
- Les fiches d'évaluation mises au point précédemment peuvent être utilisées pour autant qu'elles soient adaptées à l'étude, à l'espèce et à la souche.
- Une gestion électronique des données contribue à garantir la cohérence et offre un accès aisé à toutes les informations pertinentes.
- L'emploi d'un langage et d'une terminologie standardisés est recommandé.
- Les données enregistrées doivent être aussi objectives que possible.
- Les avantages et inconvénients i) d'une notation numérique et ii) de systèmes d'observation «binaires» (où les indicateurs sont notés «présents» ou «absents») doivent être examinés au cas par cas.
- Tous les types de formulaires d'observation devraient permettre l'ajout de texte libre, en plus des indicateurs prédéterminés, de manière à pouvoir consigner des observations inattendues.
- Une formation efficace de tout le personnel concerné est essentielle. Celle-ci doit couvrir spécifiquement l'évaluation du bien-être et de la gravité, ainsi que les techniques de suivi.
- Un plan de communication doit être défini et doit inclure tout le personnel concerné. Il devrait en outre prévoir un mécanisme permettant de

communiquer rapidement des résultats inattendus à tous les intéressés et, le cas échéant, aux autorités compétentes.

- Le suivi doit être proportionné aux effets anticipés. Ainsi, les procédures susceptibles de provoquer des souffrances «sévères» requerront généralement un suivi plus fréquent et détaillé.
- Il conviendrait de disposer de critères d'intervention clairs, notamment si certains paramètres sont observés ou si l'on s'approche d'un degré de souffrance prédéfini. Tout le personnel concerné doit connaître ces critères, savoir ce qu'il convient de faire et qui contacter le cas échéant.

Si le processus d'évaluation de la gravité est mis en œuvre de manière efficace, les animaux et tout le personnel préposé à leur utilisation et à leur entretien tireront avantage de l'amélioration du bien-être animal, d'une validité scientifique accrue et d'une plus grande transparence.

Une bonne communication interne et externe concernant le processus d'évaluation de la gravité et l'application des 3R devraient offrir des avantages encore plus grands.

Annexe I

Glossaire des observations cliniques

Le succès de tout programme d'évaluation de la gravité dépend de la sélection d'indicateurs de bien-être:

- **aisément appréciables et fiables**
- **efficaces pour mesurer le bien-être de manière appropriée,**
- pertinents pour l'étude scientifique, l'espèce et la souche (le cas échéant),
- pratiques à mettre en œuvre, sans perturber l'animal de façon excessive, et
- se prêtant à une mesure, à une interprétation et à une analyse cohérentes.

Une méthode commune d'enregistrement des observations cliniques est donc un objectif souhaitable, étant donné qu'elle contribuerait à l'élaboration de stratégies cohérentes de classification de la gravité. Cela faciliterait la comparaison des observations cliniques entre études, et constituerait une source d'informations pour les personnes intervenant dans l'évaluation de la gravité.

Les observations sont structurées sur la base des six critères transversaux suivants:

Aspect / Fonctions corporelles / Environnement / Comportements / Indicateurs spécifiques à la procédure / Observations libres

Catégories transversales	Domaines sur lesquels se concentrer lors de l'observation d'animaux	Indicateurs spécifiques à contrôler
Aspect	État corporel	Perte/prise de poids
		Obésité
		Maigreur
		Note relative à l'état corporel, si disponible

	État du pelage et de la peau	Piloérection
		Hirsute/manque de soins
		Pelage huileux
		Perte de poils
		Déshydratation – plis cutanés
		Lésions cutanées – œdème, gale, ulcère, blessure/plaie
		Taches d'urine ou de matières fécales
	Écoulement	Oculaire, nasal, uro-génital, traces de porphyrines chez certaines espèces, p. ex. les rats
	Yeux	Creux ou «ternes»
		Clos/mi-clos
		Lésions oculaires (p. ex. ulcération de la cornée)
	Bouche	Salivation
		Malocclusion/poussée dentaire anormale
Autre	Signes de douleurs sur la face – p. ex. yeux mi-clos et nez gonflé chez les souris	
	Constrictions abdominales	
	Organe ou membre hypertrophié, p. ex. abdomen distendu	
Fonctions corporelles	Respiration	Respiration accélérée (tachypnée)
		Respiration difficile (hyperpnée)
		Respiration très difficile (dyspnée)
		Respiration sifflante ou autre son lors de la respiration
	Consommation d'eau/de nourriture	Augmentée/diminuée
	Température corporelle	Hausse/baisse; température corporelle mesurée le cas échéant (p. ex. via une micropuce ou un appareil de télémétrie, thermomètre avec ou sans contact); couleur des extrémités chez les rongeurs
Sens	Baisse de la vue ou de l'audition; pertes d'équilibre	
Environnement	Environnement de la cage ou de l'enclos (litière, matériaux de nidification, éléments	Présence de matières fécales et consistance
		Litière humide du fait, p. ex. d'une polyurie
		Présence de vomissures ou de sang

	d'enrichissement)	L'animal utilise-t-il les éléments d'enrichissement, p. ex. matériaux de nidification, cubes à mâcher ?
Comportements	Interaction sociale	Changement du tempérament normal – interactions appréhensives/agressives avec d'autres animaux; anxiété (p. ex. réactions de fuite marquées, se cache)
		Isolé ou en retrait des autres animaux dans le groupe social
	Comportements indésirables	Comportement répétitif/stéréotypé
		Toilettage excessif (arrachage de poils - barbering) (rongeurs), trichotillomanie
		Agressivité accrue vis-à-vis des êtres humains et des autres animaux
	Posture et mobilité	Posture anormale
		Démarche anormale; claudication; absence de mouvement/léthargie/réticence à bouger en présence d'une stimulation
		Manque de coordination des mouvements
		Abdomen rentré; tête penchée
	Autre	Tremblements
Crises d'épilepsie/convulsions/spasmes		
Vocalisation; spontanée ou invoquée. <i>(Remarque: certaines espèces, notamment chez les rongeurs, vocalisent généralement dans les fréquences ultra-sons, de sorte que des vocalisations audibles doivent retenir toute l'attention. Les vocalisations des lapins sont elles aussi généralement inaudibles pour les humains, à moins que l'animal ne soit en détresse).</i>		
Indicateurs spécifiques de la procédure	Ceux-ci sont déterminés en fonction de chaque projet, de ses effets néfastes potentiels et des indicateurs attendus de ceux-ci.	Par exemple, dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, il pourrait notamment s'agir d'une perte de tonicité de la queue, d'une faiblesse des membres postérieurs ou antérieurs, d'une paralysie, de la perte de fonction de la vessie.
Observations libres	Tout programme d'évaluation de la gravité doit prévoir un système permettant de consigner toute observation d'impacts négatifs inattendus sur le bien-être.	

Annexe II

Ouvrages de référence, lignes directrices et bibliographie en ligne concernant l'évaluation du bien-être des animaux soumis à des procédures scientifiques

American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) (2006), *Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits*, à télécharger sur <http://www.tinyurl.com/65ez5vh> (en anglais).

Assessing the Health and Welfare of Laboratory Animals (AHWLA) training resource. Voir <http://www.ahwla.org.uk/index.html> (en anglais).

Conseil canadien de protection des animaux (CCPA), *Welfare assessment*. Voir <http://www.ccac.ca/>. Cliquez sur le microsite des trois R, puis faites une recherche sur les termes «évaluation du bien-être» (en anglais ou en français).

Categorising the severity of scientific procedures on animals - Summary and reports from three round-table discussions edited by Jane A. Smith et Maggy Jennings, au nom du groupe Boyd Group et de la RSPCA, juillet 2004 (en anglais).

Publié par le département «Animaux de laboratoire» de la RSPCA.

Groupe de travail de la FELASA sur la communication des signes cliniques chez les animaux de laboratoire (2012) – (sous presse) (en anglais).

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2008), *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press (en anglais).

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2009), *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press. Voir http://dels.nas.edu/animal_pain/ (en anglais).

Johansen R, Needham JR, Colquhoun DJ, et al. (2006), Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory Animals* **40**: 323–340 (en anglais).

Joint Working Group on Refinement (2011), A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals. *Laboratory Animals* **45**: 1-13 (en anglais).

Leach MC et al. (2008) Identification of appropriate measures for the assessment of laboratory mouse welfare. *Animal Welfare* **17**: 161-170 (en anglais).

National Centre for the Three Rs (NC3Rs) *Welfare assessment*. Voir <http://www.nc3rs.org.uk/welfareassessment> (en anglais).

National Health and Medical Research Council (2008), *Guidelines to Promote the Wellbeing of Animals Used for Scientific Purposes: The Assessment and Alleviation of Pain and Distress in Research Animals*. Canberra: Gouvernement australien. Voir <http://www.nhmrc.gov.au> (en anglais). Faites une recherche sur les termes «pain and distress».

Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 19. Paris: OCDE (en anglais).

Wells DJ, Playle LC, Enser WEJ, et al., Assessing the welfare of genetically altered mice. Voir la version intégrale à l'adresse <http://www.nc3rs.org.uk/gamice> (en anglais). Résumé dans *Laboratory Animals* **40**: 111–114 (en anglais).

Workman P et al. (2010), Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* **102**: 1555-1577, à télécharger à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/?tool=pubmed> (en anglais).

1.2 Revues proposées pour aller plus loin (en anglais)

<i>Applied Animal Behaviour Science</i>	http://www.applied-ethology.org/applied_animal_behaviour_science.html
<i>Animal Technology and Welfare</i>	http://www.iat.org.uk/publications/atw.htm
<i>Animal Welfare</i>	http://www.ufaw.org.uk/animal.php
<i>Contemporary Topics in Laboratory Animal Science</i> et <i>Journal of the American Association for Laboratory Animal Science</i>	http://www.aalas.org/publications/index.aspx#ct
<i>Lab Animal</i> et <i>Lab Animal Europe</i>	http://www.labanimal.com/labanimal/index.html http://www.labanimaleurope.eu/
<i>Laboratory Animals</i>	http://la.rsmjournals.com/

1.3 Mots clés suggérés pour la recherche d'autres informations

Les mots clés suivants vous aideront dans votre recherche d'informations sur l'évaluation de la gravité:

affecter	évaluation dommages- avantages	indicateurs positifs	échelle de gravité
bien-être animal	points limites	bien-être	comportement pathologique

souffrance animale	besoins	évaluation qualitative du comportement	stress
évaluation	évaluation objective	qualité de vie	souffrance
inconfort	douleur	raffinement	évaluation du bien-être
angoisse	évaluation de la douleur	grilles d'évaluation	indicateur de bien-être
évaluation des dommages	mesure de la douleur	système d'évaluation	résultats en matière de bien-être

Références concernant la détermination des classes de gravité réelle

CCPA (1998), *Guidelines on: Choosing an Appropriate Endpoint in Experiments Using Animals for Research, Teaching and Testing*. Conseil canadien de protection des animaux, disponibles à l'adresse: http://www.ccac.ca/en_/standards/guidelines (en anglais) et http://www.ccac.ca/fr_/normes/lignes_directrices (en français).

Groupe de travail de la FELASA sur la souffrance et l'angoisse (1994), Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. *Laboratory Animals* **28**: 97-112 (en anglais).

Jones HRP, Oates J. et Trussell BA (1999), An applied approach to the assessment of severity. In: Hendriksen CFM. et Morton DB (éd.), *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research*. Actes de la Conférence internationale, du 22 au 25 novembre 1998, Zeist, Pays-Bas. Royal Society for Medicine Press Ltd., Londres, p. 40-47 (en anglais).

LASA /APC (2008), *Final Report of a LASA/APC Working Group to Examine the Feasibility of Reporting Data on the Severity of Scientific Procedures on Animals*. Ce document est disponible à l'adresse suivante: <http://www.lasa.co.uk/publications.html> (en anglais).

Morton, DB et Hau J. (2011), Chapter 18: Welfare assessment and humane endpoints. In: *Handbook of Laboratory Animal Science, 3rd Edition, Volume 1 Essential Principles and Practices*. Hau J. et Schapiro, SJ (éd.), CRC Press LLC, États-Unis, p. 535-572 (en anglais).

Prescott MJ, Morton DB, Anderson D, Buckwell A, Heath S, Hubrecht R, Jennings M, Robb D, Ruane B, Swallow J et Thompson P (2004), Refining dog husbandry and care, Eighth report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* **38 Suppl. 1**: S1:1-S1:94 (en anglais).

Wolfensohn S et Lloyd M (2003), *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 3rd Edition*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford (en anglais) (une quatrième édition est en préparation).

(Toutes les adresses ont été vérifiées pour la dernière fois le 24 mai 2012.)

Illustration des procédures de classification de la gravité, d'évaluation journalière et d'appréciation de la gravité réelle à l'aide d'exemples

Bruxelles, le 11 janvier 2013

Le document de travail en vue de l'établissement d'un cadre d'évaluation de la gravité des procédures élaboré par le groupe d'experts de la Commission européenne et approuvé par les autorités nationales chargées de la mise en œuvre de la directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques lors de leur réunion de juillet 2012 recommandait que des exemples permettant d'illustrer la «répartition en classes de gravité, l'évaluation journalière et l'appréciation finale de la gravité réelle» soient mis au point et proposés à la communauté scientifique.

En conséquence, le groupe d'experts a produit plusieurs exemples afin de montrer comment le processus décrit dans le *document de travail* pouvait être appliqué à différentes procédures. Ces exemples ont pour vocation d'aider les autorités compétentes, les utilisateurs, les technologues préposés aux animaux, les vétérinaires et tout autre intervenant à garantir une anticipation, une détection et une atténuation efficaces de la douleur, de la souffrance et de l'angoisse des animaux et, dans la mesure du possible, une évaluation cohérente de celles-ci au cours des procédures. Le présent document a été approuvé par les autorités nationales chargées de la mise en œuvre de la directive 2010/63/UE lors de leur réunion des 23 et 24 janvier 2013.

Lors de l'utilisation de ces exemples, il est capital de ne pas perdre de vue les principes suivants:

- De **bonnes pratiques sont censées être mises en œuvre** tout au long du projet en ce qui concerne l'hébergement, l'élevage et les soins, les procédures de raffinement, l'éducation et la formation, l'évaluation des compétences, la recherche documentaire et l'utilisation des dernières connaissances en matière de remplacement, de réduction et de raffinement, ainsi que la conception des études expérimentales.

- Les grilles d'évaluation proposées dans les exemples sont destinées à **compléter l'appréciation d'un personnel qualifié, compétent et empathique, et non à s'y substituer**. Elles ont pour but de systématiser et d'objectiver l'observation, la consignation et l'évaluation de la souffrance, mais ne peuvent en aucun cas remplacer le jugement d'un professionnel.
- Chaque exemple fait référence à une **situation hypothétique mais réaliste**. Il ne nous a pas semblé approprié d'inclure tous les détails qui seraient disponibles dans la pratique, mais chaque exemple est assorti de suffisamment d'informations **pour expliquer comment le processus a été appliqué**.
- Comme mentionné dans le *document de travail*, il est essentiel **de penser et de concevoir les évaluations de la gravité** en fonction de l'espèce, de la souche et de la procédure telle qu'elle est exécutée dans l'établissement de l'utilisateur. En conséquence de quoi, le groupe d'expert **déconseille vivement d'utiliser** tels quels les tableaux et grilles d'évaluation des exemples, **même pour des procédures identiques**. Tous les protocoles d'évaluation de la gravité doivent régulièrement faire l'objet d'un contrôle d'efficacité et être revus le cas échéant.
- Les **exemples seront eux aussi revus** à mesure que les connaissances relatives aux indicateurs de douleur, de souffrance et d'angoisse s'étofferont et que les méthodes d'évaluation et de classification de la gravité évolueront. Chaque exemple est daté. Veuillez consulter le site internet de la Commission européenne http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/interpretation_en.htm (en anglais) afin de vérifier si des mises à jour sont disponibles.
- **Tout retour d'informations** concernant l'utilité des exemples est le bienvenu, de même que les suggestions de procédures à inclure. Veuillez envoyer vos commentaires à l'adresse env-laboratory-animals@ec.europa.eu.

Table des matières

Modèle 1 – Études oncologiques	26
<i>Modèle 1(a) – Maintien de lignées cellulaires tumorales humaines chez des souris nudes immunodéprimées</i>	27
<i>Modèle 1(b) Efficacité de nouveaux produits pharmaceutiques sur la croissance tumorale</i>	33
Modèle 2 – Encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) chez les souris	41
Modèle 3 – Arthrite	51
Modèle 4 – Accidents vasculaires cérébraux	62
Modèle 5 – Production d’anticorps polyclonaux chez les lapins	75
Modèle 6 – Production et élevage d’animaux génétiquement modifiés (GM).....	82
<i>Modèle – GeneA^{tm1a(Funding)Lab}</i>	84
<i>Modèle –Tg(GeneB)^{Labcode}</i>	89
<i>Modèle – GeneC^{tm1a(Funding)Lab}</i>	92

Exemples illustrant la détermination des classes de gravité

Modèle 1 – Études oncologiques (1a et 1b)

Dernière mise à jour: 05 février 2013

1. Modèles animaux dans les études oncologiques (1a et 1b)

Contexte général: évaluation de nouveaux produits anticancéreux *in vivo*

Le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans les pays développés, et la prévalence de la maladie augmentera inéluctablement avec le vieillissement de la population. En 2010, dans l'Union européenne, la probabilité de mourir d'un cancer avant l'âge de 70 ans était environ d'une chance sur sept. Il est donc nécessaire de mettre au point de nouveaux médicaments plus efficaces dans le traitement contre le cancer. Cela permettrait d'une part de réduire la mortalité due au cancer et d'autre part d'améliorer la qualité de vie des personnes qui développeront un cancer à l'avenir.

Des modèles animaux sont actuellement utilisés dans la mise au point de nouveaux médicaments contre le cancer, en plus des modèles informatiques et des méthodes *in vitro* telles que les essais sur des cultures cellulaires. Une fois la sélectivité et l'activité des composés confirmées *in vitro*, seuls les composés présentant des caractéristiques favorables sont testés sur des animaux. Des études de tolérance sont réalisées sur de petits groupes d'animaux afin d'établir la dose maximale tolérée (DMT) et l'adéquation du dosage avant de procéder à des études d'efficacité de plus grande envergure.

La gravité des effets sur les animaux dépend des modèles et de l'objectif de l'étude. Ainsi, le maintien de lignées de cellules tumorales ne devrait pas avoir d'impact significatif sur le bien-être des animaux, pour autant que de bonnes pratiques soient observées tout au long de l'étude, notamment un suivi approprié de l'animal et l'adoption de points limites précoces. Il n'en va pas de même des études visant à évaluer les nouveaux traitements sur des modèles métastatiques, lesquelles sont susceptibles d'avoir un impact plus grand sur le bien-être eu égard au développement de tumeurs multiples et aux effets secondaires probables des médicaments cytotoxiques.

Plusieurs lignes directrices relatives au bien-être et à l'utilisation des animaux dans la recherche contre le cancer ont été publiées, notamment dans le *British Journal of Cancer* (Workman et al. 2010). Elles fournissent un aperçu détaillé des divers modèles tumoraux animaux disponibles, de leur impact sur les animaux et des méthodes permettant de limiter la souffrance au strict minimum.

Deux exemples sont fournis ici pour illustrer des modèles animaux de différentes classes de gravité utilisés en oncologie.

Référence

Workman et al. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* (2010) 102(11), 1555 – 1577; disponible gratuitement au téléchargement à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/pdf/6605642a.pdf>

1 (a) – Maintien de lignées cellulaires tumorales humaines chez des souris nudes immunodéprimées

Certaines lignées cellulaires tumorales humaines ne se répliquent pas de manière fiable en culture et il est parfois nécessaire de caractériser et de maintenir des lignées cellulaires humaines dans un modèle *in vivo* xénogénique.

Étude

30 souris BALB/C nudes mâles recevront, en injection sous-cutanée sur le flanc gauche, 10^3 de suspension cellulaire HCT 116 dans 0,1 ml de sérum physiologique. Les animaux seront hébergés en groupe, dans des cages à ventilation individuelle, avec litière et matériaux de nidification. Leur bien-être sera évalué quotidiennement et les animaux seront pesés tous les quatre jours. Les individus seront palpés à la recherche de tumeurs un jour sur deux, et les éventuelles tumeurs détectables seront mesurées elles aussi un jour sur deux à l'aide d'un calibre à coulisse. Les animaux seront euthanasiés au 15^e jour en vue de prélever les tumeurs.

Évaluation prospective initiale et prise en compte de raffinements et points limites spécifiques

Quelles actions cette étude suppose-t-elle à l'égard des animaux?	Que ressentiront les animaux? Quelle souffrance cette étude est-elle susceptible de provoquer? Qu'est-ce qui pourrait faire empirer les choses?	Comment la souffrance sera-t-elle réduite au minimum?	
	Effets indésirables	Méthode et interventions	Points limites
Entretien de souris immunodéprimées	Les animaux sont susceptibles de contracter des infections	<p>Hébergement dans des cages à ventilation individuelle et pratiques d'élevage étudiées pour réduire les risques de contamination</p> <p>Hébergement des animaux en groupe et enrichissement environnemental en vue de réduire le stress</p> <p>Les méthodes d'élevage et de soin seront revues si des signes d'angoisse, d'agressivité ou des comportements anormaux sont observés</p>	Tout animal présentant des signes de mauvaise santé sera euthanasié
Injection sous-cutanée de cellules tumorales	Inconfort transitoire après l'injection	<p>L'injection ne sera effectuée qu'une seule fois</p> <p>Un volume approprié sera injecté (max. 0,2 ml)</p> <p>Les animaux seront surveillés de près immédiatement après l'injection</p>	Les animaux seront euthanasiés si une angoisse ou un inconfort plus que légers, sans récupération rapide, sont observés après l'injection (très rare)

Croissance de la tumeur	<p>Peut causer un inconfort ou affecter le comportement ou la locomotion</p> <p>La tumeur peut s'infecter ou s'ulcérer (mais ne devrait pas métastaser)</p>	<p>La croissance tumorale sera mesurée un jour sur deux</p> <p>Le programme de surveillance inclura une observation minutieuse de la posture, de la démarche, ainsi que de la taille et de l'état de la tumeur</p>	<p>Les animaux seront euthanasiés si la tumeur s'ulcère, si elle les empêche de se comporter, de se tenir ou de se déplacer normalement ou si elle dépasse un diamètre de 1,2 cm (Workman et al. 2010)</p>
--------------------------------	---	--	--

Analyse

Les animaux ne devraient ressentir qu'un inconfort **LÉGER** et seront euthanasiés si des problèmes de santé ou de bien-être au-delà de ce niveau sont observés.

Une classification prospective dans la classe de gravité LÉGÈRE est donc appropriée.

Un exemple de fiche d'observation complétée est fourni à la fin de ce modèle.

Observations cliniques

Une grille d'évaluation de base a été élaborée. Elle met l'accent sur la taille de la tumeur, le poids corporel, la posture et la démarche, car peu d'autres signes cliniques étaient attendus. Des emplacements ont été prévus pour consigner, sous la forme de texte libre, l'observation de signes cliniques inattendus. L'indication AAD (aucune anomalie détectée) confirme que les animaux ont été examinés et qu'aucune anomalie n'a été relevée. Un exemple est fourni ci-dessous.

Résultats

- Aucune perte de poids significative n'a été observée chez les animaux.
- Aucun développement tumoral n'a été constaté chez cinq animaux.
- Vingt-cinq animaux ont développé des tumeurs au niveau du flanc. Ces tumeurs n'ont eu aucun impact sur leur comportement normal. Elles mesuraient un maximum de 1 cm au jour 14, lorsque les animaux ont été euthanasiés pour prélever les tumeurs, conformément au protocole de l'étude.

- Des comportements agressifs et des bagarres ont été observés dans une cage; un animal présentait des morsures sur la queue et sur le dos et a été isolé dans une cage individuelle. Ses plaies ont été désinfectées localement tous les jours jusqu'à leur guérison complète, et l'animal a été conservé jusqu'à la fin de la procédure.

Évaluation de la gravité réelle

- Vingt-neuf animaux sont arrivés au terme de l'étude sans avoir subi plus qu'une souffrance légère liée à l'injection et à la croissance des tumeurs. La gravité réelle de l'étude a été jugée **LÉGÈRE**. Un animal a été mordu, mais ses plaies ont pu être soignées. Du fait de cette agression, l'animal a subi une souffrance supplémentaire, qui n'avait néanmoins pas de lien avec la procédure. Ces incidents ont été gérés avec efficacité, et la souffrance de l'animal a pu être atténuée. Bien que le degré de souffrance ressenti par cet animal ait été modéré, la gravité réelle de l'étude a été jugée **LÉGÈRE** puisque cet incident était indépendant des procédures mises en œuvre.

Exemple de fiche d'observation (complétée pour notre cas hypothétique)

Croissance tumorale chez des souris nues – Fiche de procédure et d'observation				
Cage 1 – Souris 1 à 5				
Date	Procédure	Taille de la tumeur (cm)	Poids (g)	Observations cliniques – examiner la posture et la démarche avec attention
28/02	Injection s.c.		1- 21 2- 22 3- 21 4 -22 5- 22	Aucun signe de problèmes de bien-être après l'injection
01/03				Aucune anomalie détectée (AAD)
02/03	Palpation			AAD
03/03				AAD
04/03	Palpation		1- 21 2- 22 3- 21 4 -22	AAD

			5- 22	
05/03				AAD
06/03	Palpation			AAD
07/03				Quelques comportements agressifs; aucune plaie apparente
08/03	Mesure des tumeurs	1 – 0,1 2 – 0,1 3 – 0,1 4 – aucune tumeur 5 – 0,2	1- 21 2- 22 3- 21 4 -22 5- 22	La souris 1 présentait des morsures sur la queue et le dos – traitement local; elle a été transférée dans une cage individuelle. Nid fourni pour l’animal logé seul, mais retiré de la cage hébergeant les quatre souris restantes au cas où il s’agirait du déclencheur de leur agressivité.
09/03				Plaies de la souris 1 désinfectées, guérissent bien; aucun signe d’agressivité entre les animaux restants
10/03	Mesure des tumeurs	1 – 0,2 2 – 0,1 3 – 0,1 4 – aucune tumeur 5 – 0,2		Plaies de la souris 1 désinfectées

11/03				Plaies de la souris 1 désinfectées
12/03	Mesure des tumeurs	1- 0,4 2 – 0,3 3 – 0,3 4 – aucune tumeur 5 – 0,5	1- 22 2- 22 3 – 21 4 -21 5- 23	Plaies de la souris 1 désinfectées, arrêt de la désinfection
13/03				AAD
14/03	Euthanasie et prélèvement des tumeurs			

1 (b) Efficacité de nouveaux produits pharmaceutiques sur la croissance tumorale – procédure en plusieurs étapes

Cette étude vise à évaluer l'efficacité de nouveaux produits dans la réduction ou l'arrêt de la croissance des cellules tumorales. La tumeur doit être bien établie avant que le traitement puisse commencer (un diamètre de 0,5 cm est généralement suffisant). Compte tenu de la durée de l'étude, certaines tumeurs peuvent atteindre un diamètre maximal de 1,2 cm, généralement au sein du groupe de contrôle ayant reçu le véhicule. Les médicaments cytotoxiques sont susceptibles d'avoir des effets indésirables pour le bien-être.

30 souris BALB/C nudes mâles recevront une injection de cellules tumorales à croissance lente (0,1 ml). Leur bien-être sera évalué quotidiennement, et les animaux seront pesés une fois par semaine pendant trois semaines consécutives. La croissance des tumeurs sera mesurée à l'aide d'un calibre à coulisse aux jours 7 et 14; au jour 20, les tumeurs seront à nouveau mesurées, les animaux seront randomisés et le traitement commencera sous la forme d'injections intrapéritonéales biquotidiennes pendant sept jours.

Évaluation prospective initiale et prise en compte de raffinements et points limites spécifiques

Quelles actions cette étude suppose-t-elle à l'égard des animaux?	Que ressentiront les animaux? Quelle souffrance cette étude est-elle susceptible de provoquer? Qu'est-ce qui pourrait faire empirer les choses?	Comment la souffrance sera-t-elle réduite au minimum?	
	Effets indésirables	Méthode et interventions	Points limites
Entretien de souris immunodéprimées	Les animaux sont susceptibles de contracter des infections	<p>Hébergement dans des cages à ventilation individuelle et pratiques d'élevage étudiées pour réduire les risques de contamination</p> <p>Hébergement des animaux en groupe et enrichissement environnemental en vue de réduire le stress</p> <p>Les méthodes d'élevage et de soin seront revues si des signes d'angoisse, d'agressivité ou des comportements anormaux sont observés</p>	Les animaux présentant des signes de maladie intercurrente seront euthanasiés
Injection sous-cutanée de	Inconfort transitoire après l'injection	L'injection ne sera effectuée qu'une	Les animaux seront euthanasiés si une

cellules tumorales		<p>seule fois</p> <p>Un volume approprié sera injecté (max. 0,2 ml)</p> <p>Les animaux seront surveillés de près immédiatement après l'injection</p>	<p>angoisse ou un inconfort plus que légers, sans récupération rapide, sont observés après l'injection (très rare)</p>
Croissance de la tumeur	<p>Peut causer un inconfort ou affecter le comportement ou la locomotion</p> <p>La tumeur utilisée peut s'infecter ou s'ulcérer (mais ne devrait pas métastaser)</p>	<p>Observation quotidienne des animaux, surveillance régulière de leur état de santé général et de la croissance tumorale</p> <p>Le programme de surveillance inclura une observation minutieuse de la posture, de la démarche, ainsi que de la taille et de l'état de la tumeur</p> <p>Les interventions pharmaceutiques commenceront lorsque la tumeur atteindra un diamètre de 0,5 cm (mesuré à l'aide d'un calibre à coulisse)</p>	<p>Les animaux seront euthanasiés si la tumeur s'ulcère, si elle les empêche de se comporter, de se tenir ou de se déplacer normalement ou si elle dépasse un diamètre de 1,2 cm (Workman et al. 2010)</p>
Injection intrapéritonéale du nouveau produit pharmaceutique	<p>Inconfort transitoire après l'injection</p> <p>Les médicaments cytotoxiques peuvent provoquer des diarrhées, une perte de poids, de l'anorexie ou une léthargie</p>	<p>Les animaux seront surveillés de près immédiatement après l'injection</p> <p>Volume maximal de 10 ml/kg par jour pendant sept jours</p> <p>Des doses minimales seront utilisées (déterminées selon les études de</p>	<p>Les animaux seront euthanasiés s'ils perdent plus de 20 % de leur poids corporel initial. Les animaux qui ne s'alimentent pas ou présentent une diarrhée pendant plus de 48 heures seront euthanasiés.</p>

		classification des doses) Un système d'évaluation clinique sera utilisé pour apprécier le bien-être des animaux	Un score clinique maximal sera défini comme point limite humain.
--	--	--	--

Analyse

Compte tenu de la taille de la tumeur, du potentiel accru d'ulcération, de la fréquence des injections et des effets indésirables des médicaments administrés, une **classification prospective dans la classe de gravité MODÉRÉE** est appropriée.

La classe de gravité pourrait-elle être LÉGÈRE?

Cela est très peu probable, à moins que les objectifs scientifiques puissent être atteints avec des points limites plus précoces, par exemple avec une taille maximale de tumeur moindre. Cela supposerait également d'injecter les médicaments à une dose dont on sait qu'elle ne causera pas d'effets cliniques indésirables significatifs. Dans ces circonstances, une gravité LÉGÈRE pourrait être considérée comme appropriée.

Observations cliniques

Un exemple de fiche d'observation et de grille d'évaluation est fourni à la fin de ce modèle.

Résultats

Sur les 30 souris BALB/C mâles, 25 ont été utilisées en vue d'évaluer l'efficacité des produits; 10 animaux ont reçu le médicament B à la dose H, 10 le médicament B à la dose X et 5 le médicament C à la dose Y.

Évaluation de la gravité réelle

- Trois animaux n'ont pas développé de tumeurs et ont été euthanasiés car ils étaient inutilisables aux fins de l'expérimentation – **LÉGÈRE**
- Deux animaux ont développé des ulcérations sur le site d'injection de la tumeur avant le début du traitement et ont été euthanasiés – **MODÉRÉE**
- Dix animaux recevant le médicament B à la dose H ont développé des tumeurs qui sont restées relativement petites, sans perte de poids corporel significative ni signes cliniques – **LÉGÈRE**

- Sept animaux recevant le médicament B à la dose X ont vu la taille de leur tumeur diminuer. Ils présentaient une perte de poids corporel de 15 % et des selles molles, mais ont été gardés jusqu'à la fin de l'expérimentation – **MODÉRÉE**
- Trois animaux recevant le médicament B à la dose X ont vu la taille de leur tumeur diminuer. Ils présentaient une perte de poids corporel de 15 %, des selles molles, une anorexie et étaient très léthargiques. Ils ont été euthanasiés au jour 25 – **SÉVÈRE**
- Cinq animaux recevant le médicament C à la dose Y ont vu leurs tumeurs continuer à grossir, leur poids corporel a augmenté. Ils ne présentaient aucun signe clinique mis à part la croissance tumorale. Ces animaux ont été euthanasiés lorsque la tumeur a dépassé un diamètre de 1,2 cm – **MODÉRÉE**

Exemple de grille d'évaluation

Animal n°				
Date	01/06	02/06	03/06	04/06
Aspect				
Poids corporel				
État du pelage				
Fonctions corporelles				
Dyspnée et/ou tachypnée				
Prise alimentaire				
Environnement				
Selles molles ou diarrhée				

Diarrhée sanglante				
Comportements				
Manipulation				
Agressivité				
Démarche anormale				
Posture anormale				
Réticence à bouger				
Indicateurs spécifiques de la procédure				
Taille de la tumeur				
Ulcération de la tumeur				
Tumeur entravant les mouvements				
Score global				
Autres observations éventuelles				

Exemples de scores cliniques

Aspect	Score
Poids corporel	
Perte de poids de 5 à 10 %	1
Perte de poids de 11 à 15 %	2
Perte de poids de 16 à 20 %	3
Perte de poids de plus de 20 %	PLH
État du pelage	
Pelage légèrement hirsute	1
Légère piloérection	2
Horripilation marquée	3
Fonctions corporelles	
Tachypnée (respiration rapide)	1
Dyspnée (difficultés respiratoires)	3
Environnement	
Selles molles ou diarrhée	1
Diarrhée sanglante	PLH

Actions	
Score 1	Revoir la fréquence du suivi
2	Envisager des soins supplémentaires, p. ex. plus de fluides
4	Consulter un vétérinaire
6	Appliquer le point limite humain

Comportement	
Tendu et nerveux pendant la manipulation	1
Angoisse marquée lors de la manipulation (p. ex. tremblements, vocalisation, agressivité)	3
Locomotion	
Démarche/posture légèrement anormale	1
Démarche/posture anormale marquée	2
Problèmes de mobilité significatifs/réticence à bouger	3
Immobilité > 24 h	PLH
Indicateurs spécifiques de la procédure	
Taille de la tumeur > 1,2 cm	PLH
Ulcération de la tumeur	PLH
Tumeur entravant les mouvements	PLH

Exemples illustrant la détermination des classes de gravité

Modèle 2 – Encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) chez les souris

Dernière mise à jour: 05 février 2013

Contexte général

L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) est utilisée pour modéliser divers aspects de la sclérose en plaques (SEP) chez les rongeurs et les primates. La sclérose en plaques est un trouble neurologique complexe, multiforme, qui touche les jeunes adultes. Ses symptômes sont, notamment, une inflammation, une démyélinisation et une perte axonale. Des modèles animaux sont employés afin d'étudier la physiopathologie de cette maladie et d'évaluer des stratégies protectives ou curatives potentielles, dont l'immunomodulation, l'immunoprotection, la régénération axonale et la réparation de la myéline. Compte tenu de son caractère multiforme et multiphase, la SEP nécessite l'utilisation de modèles appropriés pour traiter des questions spécifiques propres aux différents stades de la maladie.

L'EAE suppose de générer une activité immunitaire ciblant la myéline, laquelle induit une inflammation du système nerveux central et une ouverture de la barrière hémato-encéphalique. Ceci peut provoquer sur le modèle animal un syndrome neurologique sévère qui devrait être suivi d'une récupération partielle au cours de la première phase chronique de poussées/rémissions. Cette phase est associée à un phénomène inflammatoire ainsi qu'à une démyélinisation réversible. Après neuf à dix semaines, l'animal entre dans la forme progressive de la maladie, laquelle est associée à une démyélinisation chronique et à une perte axonale. Au cours de cette phase, il est possible d'évaluer différentes stratégies thérapeutiques. Les points limites humains et scientifiques doivent être sélectionnés avec soin, en tenant compte des objectifs de l'étude.

Références

Emerson MR *et al.* (2009), Enhancing the ability of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis to serve as a more rigorous model of Multiple Sclerosis through refinement of the experimental design. *Comparative Medicine* **59**: 112-128.

Miller SD *et al.* (2010), Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the mouse. *Current Protocols in Immunology*. **88**: 15.1.1 – 15.1.20.

Weissert R (éd). (2012), *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis – Models, Disease Biology and Experimental Therapy*. Publié par In Tech, DOI: 10.5772/1190, <http://www.intechopen.com>.

Wolfensohn S *et al.*, Reducing suffering in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (en préparation).

Étude

Dans cet exemple, l'EAE sera induite chez huit souris Biozzi ABH (une souche communément utilisée, réputée avoir une haute valeur translationnelle), quatre mâles et quatre femelles, afin d'évaluer une thérapie potentielle contre la SEP. Au stade de la planification initiale du projet, l'utilisateur envisage tous les effets néfastes susceptibles de se produire pour les animaux et recense les causes potentielles de souffrance, en concertation avec le technologue et le personnel préposé aux soins des animaux, ainsi qu'avec le vétérinaire de l'étude. Ensemble, ils examinent les possibilités de raffinement et les mettent en œuvre dans le projet. Les souris seront hébergées collectivement, par groupe de quatre animaux de même sexe. Une attention particulière sera prêtée à l'environnement local, étant donné que les animaux ayant contracté l'EAE présenteront des déficits moteurs significatifs. Les cages comporteront un sol en dur, une litière de sciure, des refuges et des matériaux de nidification adéquats, ainsi que des blocs à ronger. Les animaux recevront un adjuvant inflammatoire, de manière à induire l'EAE, et seront surveillés pendant la récupération et la phase cyclique de la maladie (neuf à dix semaines). Lorsque la forme progressive se sera développée, les composés thérapeutiques candidats seront évalués chez les souris au cours d'une étude de trois semaines.

Évaluation prospective initiale et prise en compte de raffinements et points limites spécifiques

Quelles actions cette étude suppose-t-elle à l'égard des animaux?	Que ressentiront les animaux? Quelle souffrance cette étude est-elle susceptible de provoquer? Qu'est-ce qui pourrait faire empirer les choses?	Comment la souffrance sera-t-elle réduite au minimum?	
	Effets indésirables	Méthode et interventions	Points limites
Plusieurs injections d'adjuvant inflammatoire	Inconfort ou douleur dus à l'injection d'amorçage Réaction possible au site d'injection, provoquant irritation ou inconfort	De petites doses seront injectées en différents sites sous-cutanés (pas au niveau des coussinets plantaires ni à la base de la queue).	Les animaux seront euthanasiés si une douleur ou une angoisse plus que modérée et transitoire est observée après l'injection.

		<p>L'adjuvant et le véhicule sont formulés de manière à être les moins irritants possible.</p> <p>Les animaux seront suivis après l'injection.</p>	
<p>Induction de l'EAE – Syndrome neurologique sévère initial suivi d'une phase de récupération</p>	<p>Paralysie, potentiellement source d'angoisse ou d'anxiété: perte de tonicité de la queue, faiblesse des membres postérieurs, hypomobilité, paralysie des membres</p> <p>Troubles urinaires (incontinence ou rétention)</p>	<p>La fonction urinaire sera surveillée par l'entremise d'un examen quotidien de la vessie. En cas de rétention, la vessie sera, le cas échéant, exprimée manuellement (suivi minutieux des signes de douleurs ou d'angoisse après une vidange de la vessie).</p> <p>En cas d'incontinence, la présence de litière ou de matériaux de nidification humides dans la cage sera régulièrement vérifiée; au besoin, ils seront remplacés par des matériaux frais.</p> <p>Des refuges et des matériaux de nidification adéquats seront prévus.</p>	<p>Point limite humain pour chacun des critères suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Paralysie bilatérale des membres antérieurs pendant plus de 24 h • Paralysie bilatérale des membres postérieurs pouvant durer 5 jours • Automutilation • Rétention urinaire persistante/incapacité à vider la vessie • Parésie (perte de mouvement; légère paralysie) • Perte de poids de 35 %* • Arrêt de la prise d'alimentation ou de l'hydratation pendant plus de 24 h après le début de la maladie • Aucune récupération de l'EAE trois semaines après le début de la maladie • Signes cliniques de maladie intercurrente (p. ex. voussure du dos)
	<p>Perte de poids significative (p. ex. jusqu'à 35 %)</p>	<p>Un accès constant à des aliments et à de l'eau placés dans des récipients à même le sol de la cage sera assuré.</p> <p>Le poids corporel et l'état physique seront surveillés quotidiennement et</p>	

		<p>évalués plus fréquemment (en fonction des besoins) une fois que la perte de poids aura commencé.</p> <p>Des aliments détremvés et des blocs fluides seront fournis, avec, le cas échéant, une supplémentation par voie sous-cutanée.</p>	
Évolution clinique cyclique (poussées/rémissions)	Déficits neurologiques chroniques	<p>Tous les facteurs de stress seront réduits, y compris le niveau de bruit.</p> <p>Le cas échéant, la température ambiante sera relevée à l'aide de coussinets chauffants, et de la litière et des matériaux de nidification supplémentaires seront fournis.</p>	
Administration du nouvel agent thérapeutique (pendant la phase progressive)	<p>Inconfort dû à l'injection</p> <p>Effets secondaires ou absence d'efficacité du produit</p>	Les animaux seront suivis de près après l'injection du produit candidat.	Les animaux seront euthanasiés si l'un des indicateurs ci-dessus est observé ou si le nouvel agent thérapeutique provoque des effets secondaires graves.

* Une perte de poids de 35 % est un point limite extrême nécessitant une solide justification scientifique. Ici, une perte de poids significative est inévitable, et les animaux peuvent récupérer moyennant une aide appropriée, p. ex. un apport de chaleur supplémentaire et une augmentation des rations alimentaires, en ayant recours, au besoin, à un nourrissage manuel. Dans le cadre de cette étude spécifique, le point limite de 35 % a été fixé de manière à réduire la nécessité d'induire l'EAE chez d'autres animaux non encore exposés, qui serait nettement plus importante avec un point limite plus conventionnel (p. ex. 20 %).

Analyse

Une **classification prospective dans la classe de gravité SÉVÈRE est considérée comme appropriée**, étant donné que la procédure devrait entraîner une forte dégradation du bien-être et de l'état général de l'animal.

La gravité pourrait-elle être MODÉRÉE?

Bien que l'évaluation prospective de la gravité de ce modèle doive toujours être SÉVÈRE pour les raisons évoquées ci-avant, la classe de la gravité attribuée a posteriori pourrait être MODÉRÉE, suivant la durée de l'étude et la mise en œuvre de PLH précoces, tels qu'indiqués ici.

Observations cliniques

Au cours de l'étude, les souris ont été suivies par les technologues et le personnel chargé des soins au moyen d'un système de grilles d'évaluation clinique spécifiquement conçu pour ce protocole, après concertation entre les utilisateurs, les technologues, le personnel préposé aux soins des animaux et le vétérinaire. Ces grilles comportaient des paramètres relatifs au poids, à l'état du pelage, à la tonicité de la queue, au contrôle de la vessie, au redressement, à la démarche, à la parésie et à des signes avancés (animal couché sur le flanc; paralysie quasi-totale; respiration rapide, lente ou profonde). Eu égard à la gravité de certaines procédures incluses dans le projet, les animaux ont été suivis de très près et une surveillance continue de la gravité a été mise en place par l'utilisateur, en concertation avec la structure chargée du bien-être des animaux, les technologues et le vétérinaire désigné. Un exemple de grille de d'évaluation est fourni ci-après.

Exemple de grille d'évaluation appropriée

Tableau. Grille d'évaluation clinique utilisée pour les souris EAE

Date:					
Aspect					
Poids corporel					
État du pelage					
Fonctions corporelles					
Contrôle de la vessie					
Tonicité de la queue					
Respiration					
Environnement					
État du nid					
Comportement					
Comportement social					
Démarche					
Indicateurs spécifiques de la procédure					
Animal couché sur le					

flanc					
Temps de redressement					
Parésie					
Paralyse					
Autres observations					
(texte libre)					

Remarque: chaque indicateur a été apprécié conformément au système décrit dans le tableau ci-dessous, dans lequel (par exemple) «1» serait indiqué en regard de «Tonicité de la queue» si un relèvement moindre était observé et «2» en regard de «État du nid» si le nid était désorganisé.

Tableau. Système d'appréciation des indicateurs de la grille d'évaluation clinique EAE

Score	1=léger	2=modéré	3=sévère
Perte de poids	Jusqu'à 10 %	De 10 à 20 %	De 20 à 35 %
État du pelage	Légèrement hirsute	Manque de toilettage	Piloérection marquée/prolongée
Contrôle de la vessie – incontinence	Signes d'une certaine perte de contrôle, p. ex. présence d'une faible quantité d'urine dans le nid	«Fuites» d'urine plus prononcées	Incontinence
Contrôle de la vessie –	La vessie est palpable mais se vide	Un peu plus d'efforts sont	Incapable d'uriner sans assistance; signes d'inconfort/d'angoisse

rétenion	lors de la manipulation	nécessaires pour vider la vessie	pendant ou après la vidange manuelle
Tonicité de la queue	Redressement ou courbure moindre de la queue	Perte de tonicité dans la moitié distale de la queue	Perte de tonicité dans l'intégralité de la queue
Respiration: respiration rapide, lente ou profonde	Légère	Modérée	Marquée
État du nid	Légèrement désorganisé	Tentative de construire un nid mais désorganisation	Pas de nid
Comportement social	Aucun changement attendu en cas de souffrance légère; la notation commence à 2	Interaction avec les autres animaux réduite	Interaction considérablement moindre; passivité
Démarche	Maladroite	Traîne un membre postérieur	Traîne deux membres postérieurs
Animal couché sur le flanc	Aucun changement attendu en cas de souffrance légère à modérée; la notation commence à 3	Aucun changement attendu en cas de souffrance légère à modérée; la notation commence à 3	Présent
Temps de redressement	L'animal met du temps à se redresser lorsqu'il est placé sur le dos	Difficulté marquée à se redresser	Incapacité à se redresser dans un délai de 5 secondes après avoir été placé sur le dos
Parésie	Abduction lente des membres antérieurs lorsque l'animal est placé sur le dos	Plage d'abduction des membres antérieurs réduite lorsque l'animal est placé sur le dos	Aucune abduction des membres antérieurs
Paralyse quasi-totale ou	Aucun changement attendu en cas de souffrance légère à modérée; la	Aucun changement attendu en cas de souffrance légère à modérée; la	Présente

totale	notation commence à 3	notation commence à 3	
---------------	-----------------------	-----------------------	--

Évaluation de la gravité réelle

À la fin de la procédure, la grille d'évaluation de chaque individu a été revue de manière à voir les scores obtenus pour les indicateurs et leur évolution dans le temps.

- Deux souris ont perdu 8 % de leur poids corporel suite à l'induction de l'EAE et présentaient un pelage légèrement hirsute et une certaine lenteur dans l'abduction de leurs membres antérieurs. Elles ont toutefois enregistré un score de «2» pour tous les autres indicateurs au cours des cinq premiers jours du projet. Leurs scores sont ensuite revenus à «1» ou «0» pour chaque indicateur lors de la phase de poussées/rémissions et pendant l'essai du médicament. Gravité = **MODÉRÉE**
- Trois souris ont perdu entre 22 et 32 % de leur poids corporel et ont obtenu une combinaison de «3», «2» et «1» au cours de la phase de poussées/rémissions et pendant l'essai du médicament. Gravité = **SÉVÈRE**
- Une souris a perdu 37 % de son poids corporel pendant la phase post-induction et a été euthanasiée. Gravité = **SÉVÈRE**
- Deux souris ont perdu 15 et 18 % de leur poids corporel respectivement et ont obtenu une combinaison de «2» et «3» pour tous les autres indicateurs au cours des quatre premiers jours de l'étude. Leurs scores sont ensuite revenus à «1» ou «2» lors de la phase de poussées/rémissions et pendant l'essai du médicament. Gravité = **SÉVÈRE**

Aucune paralysie n'a été observée, et il s'est révélé trop difficile d'évaluer la respiration en cage, de sorte que ces deux indicateurs ont été supprimés des grilles d'évaluation. Il a fréquemment été relevé, dans les zones de texte libre, qu'un temps accru passé dans le refuge était un indicateur précoce de souffrance. Ce critère sera donc ajouté aux grilles des projets futurs.

La gravité a été jugée **SÉVÈRE** pour six animaux et **MODÉRÉE** pour deux autres.

Autres possibilités d'application des 3R

Après avoir évalué la gravité réelle des procédures, les utilisateurs se sont concertés avec des collègues et ont passé la littérature au crible en quête d'autres possibilités de raffinement. Les raffinements supplémentaires suivants ont été mis en évidence:

- pré-nourrissage des animaux avec des compléments alimentaires hautement énergétiques, comme de la gelée ou du lait condensé, avant d'administrer l'adjuvant;
- utilisation d'une plus faible dose d'adjuvant;
- recours à un autre protocole d'étude de manière à pouvoir réduire la durée du projet.

Ceux-ci ont été ajoutés au protocole des études futures, l'objectif étant de comparer les niveaux de gravité réelle afin de déterminer l'efficacité des raffinements.

Exemples illustrant la détermination des classes de gravité

Modèle 3 – Arthrite

Dernière mise à jour: 05 février 2013

Contexte général

Des modèles arthritiques animaux sont utilisés pour étudier la pathogenèse de la maladie et évaluer des médicaments antiarthritiques potentiels à des fins d'utilisation clinique. Parmi les principaux critères de sélection des modèles figurent dès lors les similitudes morphologiques avec la maladie humaine, et la capacité du modèle à prédire l'efficacité des composés thérapeutiques candidats chez les humains.

Parmi les modèles animaux couramment utilisés pour l'arthrite rhumatoïde, citons: arthrite à adjuvant chez le rat, arthrite induite au collagène de type II chez le rat, arthrite induite au collagène de type II chez la souris et arthrite induite par l'antigène chez plusieurs espèces (Bendele, 2001). L'injection se fait généralement à la base de la queue, étant donné que cette méthode engendre une bonne réponse immunogénique, quoiqu'il soit également fait mention d'autres sites d'injection dans la littérature. Il existe par ailleurs des variations considérables entre souches concernant la sensibilité, la gravité et la période de latence de l'arthrite. Ainsi, la sensibilité des lignées génétiquement modifiées à développer de l'arthrite peut être modifiée (renforcée ou réduite) suivant les effets des manipulations génétiques. Dans les modèles animaux de l'arthrite qui ont été fréquemment utilisés et sont donc validés à suffisance, l'apparition de la maladie est prévisible et les techniques d'évaluation sont, en principe, bien définies et caractérisées. Dans des modèles comme ceux-là, plusieurs évaluations, telles que l'analyse de la démarche et le recours aux filaments de Von Frey, peuvent être utilisées en lieu et place des seules mesures d'observation.

Veillez noter que les souches, protocoles et raffinements disponibles devraient faire l'objet d'une révision régulière de manière à pouvoir sélectionner, au cas par cas, les modèles les plus appropriés en fonction de l'objet de l'étude (Joe et al., 1999).

Le modèle présenté dans cet exemple est une arthrite induite au collagène de type II chez le rat, qui peut causer d'intenses souffrances. Une justification scientifique irréfutable est donc absolument nécessaire pour y avoir recours. Les rats sont immunisés contre le collagène hétérologue de type II, ce qui produit des lésions analogues à celles observées chez les humains atteints d'arthrite rhumatoïde (Bendele, 2001). La polyarthrite qui en résulte se caractérise par une destruction marquée du cartilage associée à un dépôt de complexes immuns sur les surfaces articulaires, à une résorption osseuse et à une prolifération périostale, avec une synovite marquée à modérée et une inflammation péri-articulaire.

Références

Bendele, A.M., Animal models of rheumatoid arthritis, *J Musculoskel Neuron Interact* 2001; 1(4):377-385

Jasemian Y et al. (2011), Refinement of the collagen induced arthritis model in rats by infrared thermography. *Br. J. Med. & Med. Res.* **1(4)**: 469-477

Joe, B., Griffiths, M.M., Remmers, E.F., Wilder, R.L., Animal models of rheumatoid arthritis, *Current Rheumatology Reports* 1999; 1 139-149

Étude

Dans cet exemple, l'arthrite sera induite chez 36 rats Lewis, 18 mâles et 18 femelles, par injection répétée de collagène et de l'adjuvant de Freund dans sa forme incomplète. Le site d'injection sera la base de la queue. Le traitement quotidien commencera dix jours plus tard (J10), lorsque l'arthrite se sera développée, et se poursuivra quotidiennement pendant 14 jours supplémentaires (jusqu'à J24). L'objectif de l'étude consistera à tester des agents thérapeutiques présumés. Les données publiées antérieurement sur des composés connexes ont été consultées afin de déterminer si l'administration d'analgésiques interférerait avec les objectifs scientifiques. Il a été établi que l'administration de ce type de produits fausserait les résultats de l'expérimentation. Aucun analgésique ne sera donc administré pendant le développement de l'arthrite, groupe de contrôle compris, et une attention particulière sera accordée aux méthodes non pharmacologiques d'atténuation de la douleur (p. ex. raffinement des conditions d'élevage) en vue de soulager les animaux.

Tous les animaux seront observés et pesés quotidiennement. Ils seront évalués sur une grille d'évaluation clinique générale et feront l'objet de tests aux jours J0 (avant la première injection), J10 (avant le début du traitement), J13, J16, J20 et J24. Les tests incluront des mesures indirectes de la dégradation des fonctions physiques, telles que le diamètre des articulations (mesuré à l'aide de calibres à coulisse) et une évaluation clinique reposant sur un système d'évaluation de l'arthrite. Des points limites humains seront appliqués sur la base des scores cliniques (voir ci-dessous).

Évaluation de nouveaux produits pharmaceutiques thérapeutiques dans un modèle arthritique chez les rats (collagène de type II)

Gravité SÉVÈRE

Quelles actions cette étude suppose-t-elle à l'égard des animaux?	Que ressentiront les animaux? Quelle souffrance cette étude est-elle susceptible de provoquer? Qu'est-ce qui pourrait faire empirer les choses?	Comment la souffrance sera-t-elle réduite au minimum?	
	Effets indésirables	Méthode et interventions	Points limites
Injections sous-cutanées de collagène bovin de type II dans l'adjuvant de Freund sous sa forme incomplète (FIA) à la base de la queue à un maximum de trois reprises	<p>Stress de la contrainte</p> <p>Douleur transitoire, œdème modéré au site d'injection et inconfort pendant un jour ou deux</p> <p>Ulcération cutanée possible mais très peu probable avec le FIA</p>	<p>Attitudes empathiques et manipulation compétente tout au long des procédures</p> <p>Dose standardisée et formulation sélectionnée pour réduire au maximum les œdèmes et la douleur</p>	<p>Si l'ulcération cutanée persiste ou si les ulcères s'infectent, les animaux seront euthanasiés</p>
Développement de l'arthrite (D0-D10)	<p>Inconfort, douleur, handicap et angoisse; l'animal peut présenter des signes de mauvaise santé, dont pelage terne, inappétence, réticence à bouger, perte de poids, œdème des articulations, vocalisation audible lors de la manipulation</p>	<p>Suivi clinique minutieux à l'aide d'une grille d'évaluation clinique générale, avec une augmentation de la fréquence à l'apparition de signes cliniques (généralement autour des jours J8 à J10)</p> <p>Supplément de litière douce et de matériaux de nidification fourni tout au long de l'étude</p>	<p>Les animaux seront euthanasiés lorsqu'ils atteindront les scores cliniques prédéterminés pour les points limites humains (voir tableau ci-dessous)</p>

		<p>Accès facile à l'eau et à la nourriture (p. ex. à même le sol de la cage) tout au long de l'étude</p> <p>Un système d'évaluation clinique de l'arthrite sera utilisé. Celui-ci sert à mesurer le degré d'enflure et le nombre d'articulations concernées.</p>	
<p>Administration de produits pharmacologiques (test et contrôle, deux fois par jour) par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale (de J10 à J24)</p>	<p>Inconfort transitoire après l'injection</p> <p>Sur la base des données animales antérieures, aucun effet indésirable des produits pharmaceutiques n'est attendu</p>	<p>Surveillance clinique quotidienne minutieuse à l'aide d'une grille d'évaluation clinique générale</p>	<p>Les points limites humains seront appliqués si des effets indésirables significatifs se produisent</p>
<p>Évaluation des effets des produits pharmacologiques sur la sévérité de l'arthrite (J0, J10, J13, J16, J20 et J24)</p>	<p>Suivant les méthodes utilisées (p. ex. recours aux filaments de Von Frey, utilisation de calibres à coulisse, manipulations requises), d'autres douleurs ou inconforts transitoires peuvent se manifester</p>	<p>Suivi clinique minutieux</p> <p>Réduction de la fréquence du suivi (au minimum possible pour la réalisation des objectifs scientifiques) jusqu'à ce que l'animal se rétablisse</p>	<p>Voir tableau ci-dessous</p>

Remarque

Un système d'évaluation clinique et un système d'évaluation de l'arthrite devraient être étudiés par le chercheur, le vétérinaire, les technologues et le personnel préposé aux soins des animaux et faire l'objet d'un accord avant le début de l'étude.

Analyse

Compte tenu de la probabilité d'un impact clinique significatif sur l'animal, susceptible de se prolonger pendant plusieurs semaines, une classification prospective dans la classe de gravité **SÉVÈRE** est jugée appropriée.

La gravité pourrait-elle être MODÉRÉE?

La possibilité de ramener la classe de gravité à «modérée» dépend de l'objectif de l'étude. Ainsi, moyennant un suivi fréquent et détaillé des animaux et la possibilité de mettre en œuvre des points limites précoces (p. ex. à l'apparition d'une boiterie, ou après une période de légère boiterie d'un membre, ou si des méthodes d'imagerie in vivo sont utilisées pour détecter une modification précoce de la pathologie articulaire), il peut être possible de classer la procédure comme MODÉRÉE. Des points limites précoces comme ceux-là (p. ex. mettre un terme à l'étude à J6 après imagerie) peuvent être envisagés dans les projets visant à examiner les modifications inflammatoires précoces. De même, les traitements prophylactiques (commençant avant que l'arthrite se soit complètement développée) au moyen de nouveaux produits pharmaceutiques présentant une forte action anti-inflammatoire et inhibant le développement de l'arthrite peuvent également conduire à une réduction de la gravité à **MODÉRÉE**. Toutefois, le type d'étude illustré ici vise à évaluer les traitements ciblant une arthrite établie, de sorte que la classe de gravité reste **SÉVÈRE**.

La gravité pourrait-elle dépasser la limite supérieure?

En vertu de l'article 15, paragraphe 2, de la directive, «*les États membres veillent à ce qu'une procédure ne soit pas exécutée si elle implique une douleur, une souffrance ou une angoisse intense susceptible de se prolonger et qui ne peut pas être soulagée*». Cette étude est susceptible de causer une souffrance intense pendant plusieurs semaines, ce qui devrait être considéré comme une période de longue durée. Si une arthrite sévère devait se développer sur les quatre pattes de l'animal et ne pouvait être soulagée, l'étude dépasserait le plafond fixé en matière de gravité, et il serait nécessaire d'y apporter des raffinements considérables ou d'invoquer la «clause de sauvegarde» (article 55 de la directive) et de demander l'autorisation de la Commission.

Toutefois, dans cet exemple, des mesures ont été mises en place en vue de réduire la souffrance – tout en tenant compte de l'objectif scientifique – notamment en raffinant la composition, l'administration et le choix de l'adjuvant, en ne permettant à l'arthrite de se développer que dans les membres postérieurs, en offrant un environnement confortable et un accès aisé à l'eau et à la nourriture ainsi qu'en appliquant un système de suivi complet et des

points limites humains. Ce projet ne serait donc pas considéré comme dépassant la limite supérieure et peut être autorisé pour autant que l'évaluation du projet soit par ailleurs positive et inclue un examen des avantages et des inconvénients.

Un exemple de grille d'évaluation clinique pour l'observation journalière des rats arthritiques est fourni ci-dessous.

Date:	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4
Aspect				
Poids corporel				
Manque de toilettage				
Déshydratation				
Fonctions corporelles				
Dyspnée				
Tachypnée				
Comportement				
Réticence à bouger				
Léthargie/apathie				
Immobilité				
Vocalisation				
Indicateurs spécifiques de la procédure				
Score des pattes arthritiques				

(cf. tableau 2)				
Autres observations				
(texte libre)				
Score global				

Remarque: chaque indicateur a été apprécié conformément au système des tableaux 1 et 2 ci-dessous. Par exemple, dans la grille d'évaluation, «1» serait indiqué en regard de «Manque de toilettage» (tableau 1) et «5» en regard de «Indicateur spécifique de la procédure» si les deux membres postérieurs obtenaient respectivement les notes «3» et «2» (tableau 2). Les actions et les points limites définis ci-dessous tiennent compte de l'exigence d'éviter autant que possible des souffrances intenses mais aussi de ne pas euthanasier les animaux avant d'avoir obtenu suffisamment de données, ce qui rendrait nécessaire l'utilisation d'autres animaux non encore exposés.

Tableau 1. Système d'évaluation des indicateurs de la grille d'évaluation clinique

	Score
Aspect	
Normal; perte de poids < 5 %	0
Perte de poids de 5 à 10 %	1
Perte de poids de 11 à 15 %	2
Perte de poids de 16 à 20 %	3
Perte de poids de plus de 20 %	PLH
Manque de toilettage	1
Persistance du pli de la peau/déshydratation	1
Fonctions corporelles	
Dyspnée	2
Tachypnée	1

Tableau 2. Indicateur spécifique de la procédure - scores des pattes arthritiques

0	Normal
1	Érythème et enflure d'une cheville
2	Érythème et enflure d'une cheville ainsi que de la moitié proximale des articulations des tarses
3	Érythème et enflure d'une cheville ainsi que de toutes les articulations des tarses, jusqu'aux articulations métatarsiennes
4	Érythème et enflure de toute la patte, y compris des doigts

Ce système d'évaluation de l'arthrite utilisé comme indicateur spécifique de la procédure repose sur une aggravation de l'enflure et de l'érythème péri-articulaire. Les scores reposent sur un examen physique et une inspection visuelle. Ils sont ensuite utilisés pour calculer un «indice arthritique», défini comme la somme des scores des deux membres postérieurs.

Comportement	
Réticence à bouger	1
Léthargie/apathie	2
Immobilité persistante < 24 h	3
Immobilité > 24 h	PLH
Vocalisation en cas de manipulation	1
Vocalisation, tendu et nerveux en cas de manipulation	2
Vocalisation spontanée/en cas de mouvement	3
Indicateurs spécifiques de la procédure	
Symptômes arthritiques des pattes (cf. tableau 2)	0-8

PLH: mise en œuvre des points limites humains, indépendamment de la présence ou de l'absence d'autres signes cliniques.

Exemples d'interventions appropriées en réaction aux scores cliniques globaux

Mesure à prendre	Score global
Augmenter la fréquence du suivi; envisager un apport de fluides/soins supplémentaires	≥4
Examiner les progrès avec le vétérinaire	5-15
Point limite humain	≥16

Remarque: les scores globaux proviennent des grilles d'évaluation clinique remplies conformément aux systèmes d'évaluation des tableaux 1 et 2. Par exemple, un animal présentant une perte de poids corporel de 12 %, des signes d'un manque de toilettage et une enflure des deux chevilles postérieures obtiendrait un score global de 5.

Appréciation rétrospective

36 rats ont été immunisés à l'aide de collagène bovin de type II injecté dans l'adjuvant de Freund sous sa forme incomplète (FIA). Tous les animaux ont développé de l'arthrite. Les scores de pattes arthritiques étaient de 6 à J10. Tous les animaux présentaient une perte de poids de 5 à 10 %. Les mesures du diamètre des articulations faisaient état d'un changement significatif par rapport aux données de référence. Les observations cliniques journalières relevaient un manque de toilettage, une réticence à bouger, une apathie, une vocalisation lors de la manipulation (pendant l'observation et le changement de cage), une diminution de la prise alimentaire et des périodes d'immobilité.

- Douze animaux ont été utilisés dans le groupe traité au sérum physiologique. Les scores arthritiques les plus élevés étaient compris entre 6 et 8 pour toutes les mesures (J13, J16, J20 et J24). Les mesures du diamètre des articulations indiquaient également, à chaque échéance, une augmentation significative par rapport aux données de référence. Les scores cliniques étaient compris entre 4 et 8, avec une perte de poids corporel comprise entre 5 et 15 %, à l'exception d'un animal qui avait perdu 21 % de son poids initial à J17 et a été euthanasié.

Appréciation rétrospective: SÉVÈRE

- Douze animaux ont été traités avec le médicament A à **faible** dose. Chez aucun animal, les scores arthritiques ne se sont différenciés de ceux du groupe traité au sérum physiologique avant J16.
À J20, un animal présentait un score de 8, les autres de 6 à 7.

À J24, cinq animaux présentaient un score légèrement inférieur (5 à 7). Les signes cliniques de ces cinq animaux montraient aussi une certaine amélioration, bien que leur poids corporel ait toujours affiché une baisse de 5 à 10 % et que leur mobilité dans la cage soit restée inférieure à la normale.

Les sept autres animaux n'ont pas montré d'amélioration de leurs scores arthritiques ni de leurs signes cliniques en comparaison avec le groupe traité au sérum physiologique.

Appréciation rétrospective: SÉVÈRE

- Douze animaux ont été traités avec le médicament A à **forte** dose. À J13, les scores arthritiques étaient compris entre 4 et 6, et les diamètres des articulations affichaient une baisse non significative. Parmi les signes cliniques observés figuraient un manque de toilettage et une perte de poids corporel de moins de 10 %. À J16, les scores arthritiques avaient baissé à 4, et les diamètres des articulations avaient diminué de manière significative. Les poids corporels se sont stabilisés à J16. Une réticence à bouger était toujours observée chez certains animaux. À partir de J20, l'enflure des articulations était redescendue à un score compris entre 2 et 4. Des comportements normaux étaient observés dans la cage. Le poids corporel était revenu aux niveaux antérieurs à la procédure.

Appréciation rétrospective: SÉVÈRE

Remarque: à la fin de l'étude, dans le troisième groupe de douze animaux, le produit de test «MÉDICAMENT A» administré à forte dose avait démontré son efficacité dans la réduction de la gravité réelle à modérée. Toutefois, dans la mesure où le modèle nécessitait que l'arthrite soit établie chez tous les animaux avant le début du traitement, moment auquel les animaux présentaient des signes cliniques cohérents avec une classification «sévère», la classification de la gravité réelle pour ces animaux est restée «sévère».

Eu égard à la gravité de certaines procédures du projet, un suivi continu de la gravité a été mis en place par l'utilisateur, en concertation avec la structure chargée du bien-être des animaux, les technologues et le vétérinaire désigné, afin de s'assurer que les 3R étaient systématiquement appliqués.

Exemples illustrant la détermination des classes de gravité

Modèle 4 – Accidents vasculaires cérébraux

Dernière mise à jour: 05 février 2013

Contexte général

On entend par «accident vasculaire cérébral» (AVC) la perte ou l'altération d'une fonction corporelle normale résultant d'une irrigation insuffisante d'une zone du cerveau. Bien que la pathophysiologie des lésions vasculaires cérébrales soit mieux comprise, il n'existe pas encore, à l'heure actuelle, de traitement efficace pour celles-ci, et les recherches se poursuivent afin de trouver des mesures préventives et thérapeutiques appropriées.

On observe, chez les patients humains, trois différents types d'accidents vasculaires cérébraux: hémorragie ischémique, intracérébrale et sous-arachnoïdienne. Toutefois, la plupart des modèles animaux actuellement disponibles se fondent sur le type ischémique. Les modèles d'AVC, de par leur nature même, constituent un défi en matière de bien-être animal. Des interactions efficaces et une bonne communication entre toutes les personnes associées aux procédures scientifiques (vétérinaires, chercheurs, technologues et personnel préposé aux soins des animaux) sont absolument capitales pour garantir un juste équilibre entre l'obtention d'un modèle valable pour ce domaine de recherche et la limitation des souffrances animales.

Chez les rongeurs, les accidents vasculaires cérébraux sont habituellement provoqués en bouchant, de manière temporaire ou permanente, l'artère cérébrale moyenne (MCAO, pour *Middle Cerebral Artery Occlusion*, ou «occlusion de l'artère cérébrale moyenne»). Ce modèle MCAO vise à reproduire, de manière expérimentale, l'ischémie cérébrale focale qui se produit lors d'un accident vasculaire cérébral et a été fréquemment utilisé pour étudier le mécanisme des lésions, recenser les cibles potentielles et tester des neuroprotecteurs présumés. Des différences ont été relevées entre les souches de souris et de rats, de même qu'une influence complexe et significative de l'âge, du sexe et de la présence de comorbidités telles que le diabète, l'hypertension et l'athérosclérose. Si les recherches précliniques sur les accidents vasculaires cérébraux utilisent souvent de jeunes rongeurs mâles en bonne santé, il est possible d'explorer l'impact de facteurs tels que ceux mentionnés ci-dessus en ayant recours à des modèles présentant une comorbidité (p. ex. rats spontanément hypertendus, diabète induit par la streptozotocine chez les rats). Dans ces cas, il peut se révéler nécessaire d'observer les signes cliniques avec plus de soin et de définir des points limites humains (PLH) plus précoces.

Dans une conception d'étude standard, les animaux sont entraînés à effectuer certains tests comportementaux avant la procédure MCAO. Pendant la fenêtre de temps thérapeutique, établie en fonction du mécanisme d'action du médicament et de l'objectif de l'étude, les animaux reçoivent le composé testé. L'analyse des résultats devrait inclure des informations sur l'ampleur de l'infarctus, le taux de mortalité, la fréquence des complications (p. ex. hémorragie sous-arachnoïdienne), ainsi qu'une évaluation fonctionnelle et neurologique en vue d'évaluer les progrès accomplis. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) en série s'est révélée être un outil extrêmement utile pour obtenir des informations sur l'évolution de l'ampleur de l'infarctus dans le temps, mais aussi pour fournir des renseignements complémentaires sur la circulation sanguine ou l'état métabolique. Des points limites histologiques, biochimiques et moléculaires peuvent également être inclus.

Différents tests comportementaux peuvent être appliqués aux modèles d'AVC. Les tests les plus simples comprennent des systèmes d'évaluation neurologique qui permettent d'apprécier l'état neurologique global ainsi que des tests de placement des membres, utilisés pour mesurer les réflexes moteurs. Ceux-ci servent généralement à évaluer les animaux dans la phase aiguë qui suit l'AVC. Dans les études à long terme, des tests plus complexes peuvent être employés afin d'évaluer des fonctions sensorielles et motrices (p. ex. test de l'étiquette autocollante double face, marche sur une poutre, tige tournante ou escalier) et des fonctions cognitives telles que la mémoire (p. ex. tests d'évitement passif ou évaluation de stratégies d'apprentissage).

Une bonne pratique consiste à effectuer une batterie de tests comportementaux, dont au moins un pour chaque phase (aiguë et long terme), de manière à rassembler des informations complètes quant à l'impact sur les fonctions sensorielles, motrices et cognitives. Ces tests ont été sélectionnés avec soin pour capturer tous les effets des stratégies thérapeutiques présumées. Les descriptions détaillées de ces tests comportementaux, dont leurs échéanciers, ne sont pas incluses ici. Pour une étude et une analyse complètes de leur utilisation, veuillez consulter Schaar et al. (2010).

Références

- Braeuninger S and Kleinschnitz C., Recent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009 Nov; 1:8.
- Freret T et Bouet V., Improvements of the Stroke Model Guidelines – Animal body weight and long-term functional concerns. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009; 2(2): 28-31
- Graham SM et al., Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care. *Comparative Medicine*, 2004 Oct; 54(5): 486-496
- Yanamoto H et al., Evaluation of MCAo stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique. *ExpNeurol*, 2003 Aug; 182(2):261-74

- Liu S. et al., Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials (1st edition). Journal of experimental stroke and translational medicine, 2009 Jan 1;2(2):2-27.
- Schaar KL et al., Functional assessments in the rodent stroke model. Experimental & Translational Stroke Medicine, 2010; 2: 13; en libre accès à l'adresse <http://www.etsmjournal.com/content/2/1/13>
- Virley et al., A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with behaviour. J Cereb Blood Flow Metab, 2000;20: 563-582

Étude

Efficacité d'un nouvel agent thérapeutique sur le modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO) au moyen d'un filament intraluminal chez les rats

Dans cet exemple, 40 jeunes rats Sprague-Dawley mâles (300 à 350 g) seront soumis, sous anesthésie générale, à une MCAO permanente, au moyen de la technique du filament intraluminal. Les rats seront randomisés (n=10/groupe) et recevront soit le véhicule (10 ml/kg) soit un nouvel agent (composé A) à raison de 1, 3 ou 10 mg par kilogramme, administré en intraveineuse dans une veine caudale pendant 1 heure, 30 minutes après la MCAO. Les doses suivantes (soit de véhicule, soit du composé A à raison de 1, 3 ou 10 mg/kg) seront administrées par voie intrapéritonéale 6 et 24 heures après la MCAO. Les rats seront initialement hébergés par deux, dans des cages à sol dur, avec litière profonde et matériaux de nidification. La prise alimentaire sera restreinte avant l'entraînement, de manière à faciliter le test de l'escalier, où l'appétit est un facteur motivant. Les animaux se verront proposer des aliments *ad libitum* à partir de 6 heures pré-chirurgie et jusqu'à 6 jours post-MCAO afin de les aider à récupérer et à reprendre du poids.

Les résultats fonctionnels seront évalués quotidiennement à l'aide d'un système d'évaluation neurologique (échelle de Bederson; voir Schaar et al. 2010) et de tests comportementaux (test de l'étiquette autocollante double face et marche sur une poutre). Le test de l'escalier sera également réalisé quotidiennement à partir du septième jour post-MCAO, pour laisser à l'animal suffisamment de temps pour récupérer de l'opération avant la réintroduction de la restriction alimentaire. Aucun des tests comportementaux ne devrait causer d'angoisse significative. Une imagerie par résonance magnétique (IRM) sera effectuée chez les rats anesthésiés aux jours J1, J7, J14 et J28 en vue d'évaluer le volume des lésions. Tous les animaux seront euthanasiés 28 jours après la MCAO.

Évaluation prospective initiale et prise en compte de raffinements et points limites spécifiques

Quelles actions cette étude suppose-t-elle à l'égard des animaux?	Que ressentiront les animaux? Quelle souffrance cette étude est-elle susceptible de provoquer? Qu'est-ce qui pourrait faire empirer les choses?	Comment la souffrance sera-t-elle réduite au minimum?	
	Effets indésirables	Méthode et interventions	Points limites
Entraînement préopératoire aux tests comportementaux sur une période de deux à trois semaines: test des étiquettes autocollantes double face (négligence controlatérale), marche sur une poutre (coordination des membres postérieurs) et test de l'escalier (saisie fine des membres antérieurs)	Un stress/une anxiété minimes peuvent apparaître avant que les animaux se soient habitués aux tests, étant donné que ceux-ci supposent qu'ils soient placés dans des pièces/zones inconnues.	Acclimatation progressive aux équipements de test Manipulation calme, empathique	Retrait de la session si des signes d'angoisse sont observés Les animaux qui n'atteignent pas une performance de référence dans un délai prédéfini seront exclus de l'étude
Restriction alimentaire (85-90 % de la ration libre) préopératoire et à partir de 7 jours post-MCAO pour faciliter le test de l'escalier	Légère sensation de faim; frustration et anxiété possibles	La perte de poids ne dépassera pas 10 %, sans quoi la restriction alimentaire sera suspendue	Si des problèmes comportementaux dus à la restriction alimentaire sont observés, l'animal sera retiré de l'étude
Sous anesthésie générale, occlusion transitoire (90 min.) de l'ACM à l'aide d'un filament intraluminal avancé via l'artère	Douleur et inconfort associés à l'opération	Utilisation des produits anesthésiants appropriés, les moins aversifs possibles, avec des analgésiques appropriés (c'est-à-dire efficaces avec	Les animaux seront euthanasiés si l'un des événements suivants se

<p>carotide primitive</p>	<p>Risque de complications chirurgicales inattendues, p. ex. hémorragie sous-arachnoïdienne, lésions rétinienes ispatérales, formation d'un thrombus intraluminal, œdème cérébral, implication de l'hypothalamus avec hyperthermie ou nécrose du muscle temporal subséquentes. Celles-ci peuvent se manifester de plusieurs manières différentes, par exemple perte de connaissance soudaine, paralysie, forte inclinaison de la tête, crises d'épilepsie.</p> <p>Répulsion et effets potentiels de l'anesthésie sur les variables physiologiques (telles que l'hypothermie, l'hypotension, l'hypoxie)</p> <p>Prise nutritionnelle médiocre résultant d'un niveau de conscience réduit, d'une mastication amoindrie et d'une mobilité restreinte, généralement au cours des 48 premières heures après la MCAO</p>	<p>des propriétés neuroprotectives minimales)</p> <p>Chirurgien qualifié ayant recours à une technique chirurgicale aseptique appropriée (avec révision régulière des taux de réussite)</p> <p>Maintien de l'homéostasie pendant l'anesthésie</p> <p>Utilisation de monofilaments et d'une technique chirurgicale standardisés pour réduire la variabilité et les complications découlant de lésions extensives</p> <p>Soins postopératoires intensifs pendant les trois à cinq premiers jours, y compris sources de chaleur externes</p>	<p>produit:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Des problèmes techniques significatifs ont lieu au cours de l'opération. • L'animal ne récupère pas pleinement de l'anesthésie. • Signes de complications chirurgicales inattendues • La perte de poids corporel de l'animal dépasse 20 % de son poids préopératoire, en dépit d'une alimentation et/ou d'une réhydratation supplémentaires, ou il reste immobile pendant plus de 24 heures
---------------------------	---	---	--

	Déficit locomoteur susceptible de causer du stress et/ou de la frustration	Contrôles réguliers du poids corporel; observation et soin des plaies quotidiens Mise à disposition de nourriture et d'eau facilement accessibles pendant la période de récupération ou supplémentation alimentaire (purées, liquides) et assistance à l'alimentation si nécessaire; réhydratation (p. ex. via une injection de sérum physiologique) si nécessaire	
Tests comportementaux (test de l'étiquette autocollante bilatérale et test de marche sur une poutre) réalisés quotidiennement de J1 à J28 post-MCAO; test de l'escalier réalisé quotidiennement à partir de J7 post-MCAO	Les animaux peuvent trouver les tâches stressantes si leurs capacités motrices sont réduites	Suivi des indicateurs comportementaux d'anxiété ou d'angoisse Les animaux seront constamment observés par du personnel expérimenté	Généralement, un délai maximal est accordé pour effectuer la tâche demandée, et une note finale est attribuée
Administration d'un nouvel agent thérapeutique par voie s.c./i.v./i.p. avant et/ou après l'opération (à	Inconfort transitoire associé à la voie d'administration	Administration conformément aux bonnes pratiques, par la voie et avec les techniques les moins	Les animaux seront euthanasiés si des effets secondaires graves dus aux

des fins prophylactiques/thérapeutiques)	Aucun effet néfaste attendu aux doses administrées	douloureuses/angoissantes possible en tenant compte des objectifs scientifiques Les animaux seront observés de près afin de détecter les éventuels effets néfastes des substances testées	nouveaux agents thérapeutiques sont observés
IRM longitudinale sous anesthésie à J1, J7, J14 et J28 post-MCAO	Anesthésie répétée Répulsion et effets potentiels de l'anesthésie sur les variables physiologiques (telles que l'hypothermie, l'hypotension, l'hypoxie)	Utilisation de produits anesthésiants appropriés et les moins aversifs possibles Maintien de l'homéostasie pendant l'anesthésie, avec supplémentation de fluides avant et pendant en cas de problèmes de déshydratation et chauffage pour maintenir la normothermie	Les animaux qui ne parviennent pas à récupérer de l'anesthésie seront euthanasiés Les animaux seront euthanasiés si l'homéostasie ne peut pas être maintenue après la récupération

Analyse

Ce modèle est considéré comme SÉVÈRE à cause de la procédure chirurgicale qu'il implique, des effets néfastes (mais généralement transitoires) de la MCAO pour le bien-être de l'animal et du risque de complications périopératoires significatives. Toutefois, l'impact négatif sur le bien-être animal peut être réduit grâce à des soins postopératoires intensifs pendant les 48 premières heures au moins et à une surveillance étroite de la phase qui suit – avec une réaction rapide en cas de problèmes. Du point de vue expérimental, l'attention portée au raffinement et à la standardisation de chacune des procédures peut conduire à une réduction des risques de complications et de la variabilité et, par conséquent, déboucher sur une meilleure qualité des données et sur une diminution du nombre d'animaux utilisés.

Une classification prospective dans la classe de gravité prospective SÉVÈRE est donc appropriée.

La gravité pourrait-elle être MODÉRÉE?

Bien que l'évaluation prospective de la gravité ce modèle doive toujours être SÉVÈRE pour les raisons évoquées ci-dessus, l'incidence des effets sévères peut être réduite par l'action d'opérateurs chevronnés, grâce à une supervision vétérinaire et à des soins animaux experts, ainsi que par une intervention précoce convenue en cas de complications. Une gravité MODÉRÉE pourrait éventuellement être autorisée dans certaines circonstances, mais uniquement au cas par cas, pour des groupes de recherche individuels possédant une expérience prouvée avec ce modèle spécifique et connus pour être à même d'utiliser celui-ci sans causer plus qu'une souffrance modérée.

Observations cliniques

Les animaux sont suivis de très près au cours de la période postopératoire. Des analgésiques et une thérapie de soutien locale sont fournis si nécessaire.

Le lecteur trouvera à la fin de cet exemple un modèle de système d'évaluation neurologique/clinique combiné utilisé pour assurer le suivi de l'état clinique des animaux tout au long de la procédure.

Résultats

Tous les animaux, à l'exception d'un seul dans le groupe traité à l'aide du véhicule, se sont remis de l'opération sans complications inattendues, grâce aux soins périopératoires intensifs qui leur ont été prodigués.

- Les dix animaux traités par véhicule ont affiché le score neurologique le plus bas tout au long de l'étude et ont enregistré des performances médiocres en comparaison avec les animaux traités dans les tests comportementaux. Leur score clinique était analogue à celui des animaux traités

dans la période qui a immédiatement suivi la MCAO (premières 48 heures), après quoi des différences ont été notées chez les animaux du groupe véhicule:

- Un animal sur les dix a dû être euthanasié deux jours après la chirurgie suite à une perte de poids supérieure à 20 % (en dépit d'une supplémentation alimentaire et hydrique).

Évaluation: SÉVÈRE

- Six animaux sur dix ont développé un déficit neurologique modéré, mais leur score clinique s'est faiblement amélioré avec le temps.

Évaluation: SÉVÈRE

- Trois animaux sur dix ont développé un déficit neurologique modéré, et leur score clinique a progressivement diminué avec le temps, peut-être parce qu'ils ont pu compenser les déficits neurologiques à long terme et s'y adapter.

Évaluation: MODÉRÉE

- Les 20 animaux traités par composé A à faibles doses (1 et 3 mg/kg) ont enregistré une hausse de leur score neurologique après 48 heures post-MCAO, ainsi qu'une amélioration de leur score clinique.

Évaluation: MODÉRÉE

- Les dix animaux traités par composé A à forte dose (10 mg/kg) ont enregistré une hausse de leur score neurologique en comparaison avec le groupe véhicule à partir de 24 heures post-MCAO, n'ont connu qu'une faible perte de poids (5 %) 24 heures après la chirurgie et ont vu leur score clinique nettement s'améliorer 48 heures après la MCAO.

Évaluation: MODÉRÉE

Évaluation de la gravité réelle

La gravité a été jugée **SÉVÈRE** pour sept animaux et **MODÉRÉE** pour 33 autres.

Systeme d'évaluation

L'appréciation de la gravité s'effectue sur la base d'une combinaison d'observations cliniques générales (poids corporel, aspect, comportement, environnement de la cage) et d'une évaluation neurologique spécifique de la procédure. L'échelle de Bederson est une évaluation neurologique globale conçue pour mesurer les déficiences neurologiques faisant suite à un accident vasculaire cérébral. Une échelle de 0 à 3 est utilisée, 0 représentant la normale et 3 le degré de handicap le plus élevé. Les tests incluent une flexion des membres antérieurs, une résistance à la poussée latérale et un comportement d'encerclement.

Degré 0: aucun déficit observable

Degré 1: flexion des membres antérieurs

Degré 2: résistance à la poussée latérale (et flexion des membres antérieurs) moindre sans encerclement

Degré 3: même comportement qu'au degré 2, avec encerclement

PLH: point limite humain

	Score
Aspect	
Perte de poids de 5 à 10 %	1
Perte de poids de 11 à 15 %	2
Perte de poids de 16 à 20 %	3
Perte de poids de plus de 20 %	PLH
Pelage légèrement hirsute	1
Légère piloérection	2
Piloérection marquée	3
Comportement	
Démarche légèrement anormale	1
Démarche anormale marquée	2

Actions	
Score 1	Revoir la fréquence du suivi
4	Fournir des soins complémentaires, p. ex. plus de fluides et de la purée humide
5	Examiner les progrès avec le vétérinaire
12	Mettre en œuvre le point limite humain

Problèmes de mobilité significatifs	3
Immobilité > 24 h	PLH
Tendu et nerveux pendant la manipulation	2
Angoisse marquée lors de la manipulation (p. ex. tremblements, vocalisation, agressivité)	3
Environnement	
Nid légèrement désorganisé	1
Nid à peine reconnaissable	2
Pas de nid	3
Score neurologique	
Flexion des membres antérieurs	1
Résistance à la poussée latérale (et flexion des membres antérieurs) moindre sans encerclement	2
Même comportement qu'au degré 2, avec encerclement	3

Actions – Notez que, dans la mesure où les complications chirurgicales sont généralement observées au cours de la période qui suit immédiatement l'opération, un suivi étroit et un jugement expert, empathique, sont essentiels au cours des 24 premières heures afin de s'assurer que les effets néfastes soient détectés et des mesures prises pour y remédier, et que les animaux soient euthanasiés si leur souffrance dépasse la classe de gravité sévère.

Exemple de fiche d'observation individuelle (J0 à J4)

Jour	0	1	2	3	4
<u>Aspect</u>					
Poids corporel (g) (score)	320 (0)	292 (1)	285 (2)	287 (1)	292 (1)
<u>État du pelage</u>					
Pelage hirsute/piloérection	1	1	0	1	0
<u>Comportements</u>					
Démarche	3	2	2	2	1
Réaction à la manipulation	0	0	2	0	0
<u>Environnement</u>					
État du nid	3	2	1	0	0
<u>Score neurologique spécifique de la procédure</u>	2	2	1	1	1
Score global	9	8	8	5	3
Volume des lésions (évaluation par IRM)*		11 %			

<u>Autres observations</u>	Récupération sans problème de l'opération, aucune complication A somnolé après 30 min. et 6 h	Se déplace dans la cage et a tenté de faire un nid	Tests comportementaux, anxieux dans un premier temps, mais a tout terminé; nid plus structuré	Pelage moins bien toiletté aujourd'hui, mais poids stable et nid bien construit	Tests comportementaux terminés, moins anxieux et nette amélioration de la démarche
-----------------------------------	--	--	---	---	--

* Le «volume des lésions» (évalué par IRM) est indiqué par le chercheur à la fin de l'étude. Ces données peuvent alors être corrélées avec les observations cliniques et comportementales afin d'enrichir davantage le suivi, les soins apportés aux animaux et les procédures.

Exemples illustrant la détermination des classes de gravité

Modèle 5 – Production d’anticorps polyclonaux chez les lapins

Dernière mise à jour: 05 février 2013

Contexte général

L’objectif premier de la production d’anticorps chez les animaux de laboratoire consiste à obtenir des antisérums à titrage élevé et à haute affinité, en vue de les utiliser dans l’expérimentation ou les tests diagnostics.

Une large part de la biologie et de la biochimie modernes se fonde sur la disponibilité d’anticorps hautement spécifiques, destinés à être utilisés dans des techniques aussi diverses que l’immunohistochimie, les tests ELISA, l’immunoprécipitation et l’immunobuvardage. Par conséquent, il est essentiel, pour le succès de nombreux programmes de recherche fondamentale et appliquée, que de grandes quantités d’anticorps spécifiques ciblant protéines ou peptides d’intérêt soient produites.

Dans cet exemple, un lapin sera utilisé pour générer des anticorps ciblant de petits peptides considérés comme importants dans la régulation de la division cellulaire, dans le cadre d’un programme de recherche incluant des études biochimiques sur la division cellulaire chez les mammifères.

Références

- Conseil canadien de protection des animaux (CCPA), Lignes directrices: production d’anticorps (2002). Téléchargeable à l’adresse http://ccac.ca/Documents/Normes/Lignes_directrices/Production_anticorps.pdf
- EFPIA/ECVAM (Diehl K-H et al.) (2001), A good practice guide to the administration of substances and the removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* **21**: 15-23
- JWGR (2001), Refining procedures for the administration of substances. *Laboratory Animals* **35**: 1-41
- Keating SCJ, Thomas AA, Flecknell PA & Leach MC (2012), Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses. *PLOS ONE* **7(9)**: e44437 (en libre accès à l’adresse <http://www.plosone.org>)
- Leenars M, Hendriksen CFM (2005), Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendation. *ILAR Journal* **46**:269-279
- Stills HF (2005), Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund’s complete and other adjuvants. *ILAR Journal* **46**:280-293

- UFAW/RSPCA (2008), *Refining Rabbit Care: A Resource for Those Working With Rabbits in Research*. Southwater, UK: RSPCA (disponible gratuitement à l'adresse <http://www.rspca.org.uk/researchrabbits>)

Étude

L'expérience révèle qu'un seul lapin devrait fournir suffisamment de matériel pour chaque peptide d'intérêt. Le lapin sera hébergé dans un enclos au sol, dans un groupe stable de lapins compatibles (également utilisés pour la production d'anticorps). Il bénéficiera d'un espace adéquat se prêtant à l'enrichissement, ainsi qu'à une activité physique et à un comportement social normaux (UFAW/RSPCA 2008). L'animal sera immunisé au moyen d'un mélange d'antigène/adjuvant. À des échéances prédéterminées, des échantillons sanguins de faible volume seront prélevés afin de déterminer si l'immunisation a réussi. Lorsqu'un titrage d'anticorps adéquat aura été atteint, l'animal sera vidé de son sang sous anesthésie profonde, sans réveil, afin de collecter les anticorps qu'il contient.

La manipulation des lapins peut être stressante et doit être réservée à un personnel compétent et empathique. Le comportement des lapins peut être difficile à interpréter, et il est souhaitable de posséder une bonne connaissance de la littérature dédiée à leur comportement et à leur bien-être. Ainsi, des publications récentes ont révélé que les lapins pouvaient, dans certaines circonstances, «grimacer de douleur» (Keating et al. 2012) et que le potentiel de ce phénomène comme outil d'évaluation du bien-être devrait être exploré au cas par cas.

Eu égard à la faible immunogénicité des peptides à chaîne courte, il sera nécessaire de les administrer en combinaison avec un adjuvant. L'adjuvant de Freund dans sa forme complète (FCA) a été utilisé précédemment, mais des adjuvants synthétiques tout aussi efficaces pour cette procédure et peu irritants sont désormais disponibles.

Évaluation prospective initiale et prise en compte de raffinements et points limites spécifiques

Quelles actions cette étude suppose-t-elle à l'égard des animaux?	Que ressentiront les animaux? Quelle souffrance cette étude est-elle susceptible de provoquer? Qu'est-ce qui pourrait faire empirer les choses?	Comment la souffrance sera-t-elle réduite au minimum?	
	Effets indésirables	Méthode et interventions	Points limites
Immunisation à l'aide d'un antigène et d'un adjuvant; trois injections sous-cutanées à J8, J22 et J37	<p>Inconfort après l'injection</p> <p>Des masses indolores peuvent se développer en réponse à l'adjuvant</p> <p>Risque d'ulcération (rare) au site d'injection</p>	<p>Le volume, la formulation et la fréquence de l'injection respecteront les lignes directrices en matière de bonnes pratiques (p. ex. EFPIA/ECVAM ou JWGR), soit généralement 0,25 ml par site avec un maximum de quatre sites</p> <p>Tout ulcère recevra immédiatement un traitement vétérinaire approprié</p>	<p>Les animaux seront euthanasiés si des signes d'inconfort, de douleur ou d'angoisse prolongés (p. ex. attention persistante aux sites d'injection ou aux masses) sont observés ou si des ulcères se forment et ne guérissent pas</p>
Prélèvement sanguin afin d'évaluer les réponses immunitaires (à cinq occasions au maximum)	<p>Capture, manipulation et contrainte, sources potentielles de stress</p> <p>Inconfort mineur associé à l'aiguille</p> <p>Faible risque d'hémorragie ou d'hématome</p>	<p>L'échantillon sera prélevé sur une veine superficielle (oreille)</p> <p>Seuls de faibles volumes de sang (< 5 ml) seront prélevés pour vérifier le titrage des anticorps</p> <p>Appliquer une pression sur le site de prélèvement</p>	<p>Si l'animal est anormalement stressé par la procédure, le prélèvement sera postposé jusqu'à ce qu'il ait retrouvé un comportement normal</p>

Exsanguination sous anesthésie générale	Inconfort mineur et aversion possible à l'agent pendant l'anesthésie	Utilisation d'un agent anesthésique peu aversif	L'animal restera sous anesthésie jusqu'à son décès
---	--	---	--

Analyse

Seule une gravité légère est attendue, eu égard aux raffinements des conditions de soin et d'élevage, aux bonnes pratiques d'administration et de prélèvement et au choix d'un adjuvant peu irritant.

La classification prospective dans la classe de gravité LÉGÈRE est donc appropriée.

La procédure pourrait-elle encore être raffinée?

Il convient de vérifier régulièrement si des adjuvants moins irritants et des produits anesthésiants moins aversifs peuvent être utilisés, en consultant la littérature et en abordant la question avec des collègues. Un programme visant à habituer les jeunes lapins à être manipulés pourrait être mis sur pied afin d'encore réduire le stress (UFAW/RSPCA, 2008).

Observations cliniques

Dans la mesure où seuls des effets néfastes mineurs étaient attendus dans le cadre de cette étude, un système de suivi de base a été utilisé. En d'autres termes, l'animal faisait l'objet d'un examen quotidien, et les observations étaient consignées, mais il n'a pas été jugé nécessaire d'utiliser une fiche structurée à cette fin.

Un exemple de fiche d'observation est fourni à la fin de ce modèle.

Évaluation de la gravité réelle

Une légère enflure transitoire a été observée sur un site d'injection, mais aucun traitement n'a été requis. Le lapin a manifesté de l'attention pour les sites d'injection pendant une courte durée, mais il a été estimé que ceci n'indiquait qu'un léger inconfort. Aucune «grimace de douleur» n'a été observée.

Aucun effet secondaire n'a été noté suite au prélèvement d'échantillons sanguins sur la veine auriculaire.

Une gravité réelle **LÉGÈRE** a été jugée appropriée pour cet animal.

Exemple de fiche d'observation

Production d'anticorps chez un lapin – Fiche de procédure et d'observation		
Date	Poids corporel (kg)	Remarques
01/03	3,5	Prélèvement sanguin préalable – 5 ml au niveau de la veine auriculaire; aucun effet néfaste n'a été observé
02/03		Aucune anomalie détectée (AAD)
06/03		AAD
07/03		AAD
08/03	3,6	Immunisé – 0,25 ml x 2 sites s/c, légère attention aux sites (toiletage) pendant quelques minutes puis retour à la normale
09/03		AAD
10/03		AAD

11/03		AAD
12/03		Légère enflure molle, indolore, au site d'injection.
13/03		Toujours une légère enflure au site d'injection, pas d'aggravation
14/03		Enflure au site d'injection toujours présente, mais indolore à la palpation
15/03	3,6	Disparition de l'enflure, tout est normal

21/03		AAD
22/03	3,6	Immunisé – 0,25 ml x 2 sites s/c, brève attention aux sites

28/09		AAD
29/03	3,7	AAD
30/03		Test sanguin – 2 ml au niveau de la veine auriculaire; aucun effet néfaste

05/04		AAD
06/04	3,6	Immunisé – 0,25 ml x 2 sites

14/04	3,6	AAD
15/04		Test sanguin – 2 ml au niveau de la veine auriculaire; aucun effet néfaste

26/04		AAD
27/04	3,6	Exsanguination sous anesthésie générale, aucun effet néfaste

Il importe de conserver une trace de ce que l'animal a fait l'objet d'un examen au moins quotidien – p. ex. dans son dossier (comme ci-dessus) ou dans le registre de la salle.

Exemples illustrant la détermination des classes de gravité

Modèle 6 – Production et élevage d’animaux génétiquement modifiés (GM)

Dernière mise à jour: 05 février 2013

1. Contexte général

Le recours à des animaux génétiquement modifiés (GM) dans la recherche a contribué à une meilleure compréhension du fonctionnement des gènes et des protéines correspondantes. Des phénotypes différents peuvent avoir des effets très divers sur le bien-être animal, et certains peuvent être source de douleur, de souffrance ou d’angoisse. Si certains phénotypes et résultats sont prévisibles, beaucoup de traits secondaires ou inattendus peuvent se manifester lors de la création de lignées génétiquement modifiées, de sorte qu’il n’est pas toujours possible d’anticiper la gravité avec précision. En pratique, le phénotype n’est pas affecté dans de nombreuses lignées génétiquement modifiées, et des protocoles d’évaluation peuvent être mis sur pied afin de garantir une détection des éventuels phénotypes néfastes. Par ailleurs, le phénotype attendu peut souvent être associé à des phénotypes secondaires imprévus, qui se manifestent à des moments différents et peuvent être affectés par plusieurs facteurs environnementaux.

Lors de l’évaluation des dommages réellement infligés à l’animal, plusieurs facteurs devraient être pris en compte, dont le type de mutation, le génotype, le phénotype et la stratégie de reproduction (p. ex. éviter les phénotypes homozygotes néfastes en optant pour un accouplement hétérozygote x type sauvage), de même que la nature des éventuelles autres procédures scientifiques ou d’élevage et les effets potentiels de toutes celles-ci. Des observations systématiques et planifiées de manière adéquate, tant pendant le développement de la colonie qu’au cours de la phase expérimentale de celle-ci, sont nécessaires pour apprécier efficacement l’état de bien-être de l’animal.

Les nouvelles lignées doivent être suivies avec soin et soumises à une évaluation standard du bien-être. Toutes les lignées doivent être évaluées individuellement, par du personnel qualifié et compétent, au cours du développement et du maintien de la colonie, et des informations sur les effets néfastes spécifiques observés doivent être rassemblées et communiquées. Les procédures scientifiques requises devraient être réalisées par du personnel agréé, qui surveillera et consignera les éventuels effets sur les animaux en collaboration avec les préposés aux soins. Des points limites humains devraient être définis de manière prospective, eu égard à des paramètres tels que la perte de poids, l’état physique et les comportements inquiétants, de même qu’à des caractéristiques de développement spécifiques. Aucun animal ne devrait être maintenu en vie s’il a dépassé le plafond de gravité prévu, à moins d’un intérêt scientifique supérieur et uniquement avec l’autorisation de l’autorité compétente.

La nature, la planification et la durée des observations dépendront de plusieurs facteurs autres que la mutation appliquée. Ainsi, la souche génétique de base et les conditions environnementales dans lesquelles les animaux sont maintenus peuvent considérablement modifier l'expression du phénotype. Ces facteurs spécifiques doivent être notés avec exactitude, de manière à simplifier les comparaisons entre établissements et la surveillance des animaux génétiquement modifiés en général. La durée de vie de chaque lignée au sein d'un établissement donné devrait aussi être prise en compte, étant donné que certains phénotypes n'apparaissent que tardivement et ne seront donc observés que si les animaux sont gardés sur de plus longues durées.

Références

RSPCA GA Passport Working Group (2010), *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, UK: RSPCA (téléchargeable à l'adresse <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>)

Wells DJ et al (2006), *Assessing the welfare of genetically altered mice*. *Laboratory Animals* **40(2)**: 111-114 (téléchargeable à l'adresse <http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=356&page=231&skin=0>)

2 Exemples

Les trois exemples des sections 2.1 à 2.3 ci-dessous illustrent comment la gravité peut être évaluée chez des souris génétiquement modifiées, avec une analyse des grandes étapes du développement, de l'impact des procédures et du développement de la colonie. Chaque exemple se concentre sur les principes de l'évaluation de la gravité plutôt que de prendre en compte l'ensemble des scénarios possibles tout au long du développement de la colonie.

La création de chaque modèle suivra des procédures standardisées nécessitant la préparation chirurgicale de mâles reproducteurs vasectomisés, la manipulation d'embryons et leur implantation chirurgicale dans des femelles pseudo-gestantes receveuses. De bonnes pratiques sont réputées être appliquées en matière d'asepsie, de gestion de la douleur et de compétence du chirurgien.

La confirmation de la présence d'une progéniture dérivée de la lignée germinale ou du fondateur sera établie sur la base des échantillons de tissus obtenus consécutivement à l'identification (encochage auriculaire) ou par la méthode la moins invasive fournissant suffisamment de tissus pour une évaluation du génotype. La stratégie de phénotypage de chaque lignée dépendra du gène, du domaine de recherche et des effets prévus. La gravité sera évaluée sur la base d'une série d'observations standardisées.

2.1 Modèle de souris génétiquement modifiées – *GeneA*^{tm1a(Funding)Lab}

2.1.1 Contexte général

Une colonie de souris a été créée avec une nouvelle mutation du *GeneA* ciblant une lignée de cellules souches embryonnaires dérivée de la souche de base C57BL/6N, avec un potentiel phénotypique inconnu. Le modèle a été maintenu dans une souche de base définie (C57BL/6N). Une fois la transmission de la lignée germinale des souris G1 établie, un test d'évaluation de base du bien-être a été réalisé sur 30 petits issus de 3 à 5 portées indépendantes. Les jeunes ont été examinés à des moments prédéfinis du développement de la colonie – à la naissance, 14 jours après la naissance (en conjonction avec leur identification et le prélèvement de tissus à des fins de génotypage) et au sevrage. Une grille d'évaluation appropriée a été élaborée sur la base du système d'évaluation du bien-être des animaux génétiquement modifiés (Wells et al. 2006). Les petits ont été observés en cage par les technologues, tandis que les responsables des colonies contrôlaient les ratios génotypiques. Dans la mesure du possible, les souris ont été hébergées en groupe après le sevrage, dans des cages à ventilation individuelle contenant de la litière, des matériaux de nidification et un enrichissement environnemental approprié. Les technologues ont réalisé des évaluations en cage pendant leurs interactions quotidiennes jusqu'à ce que les souris aient atteint leur maturité sexuelle. Des évaluations à plus long terme, à la recherche d'effets néfastes pour le bien-être liés à l'âge, ont été réalisées sur les animaux de réserve et sur les futurs reproducteurs et consignées. Toutes les observations ont été comparées avec la souche de base, et leur pertinence a été évaluée.

2.1.2 Évaluation prospective

Quelles actions cette étude suppose-t-elle à l'égard des animaux?	Que ressentiront les animaux? Quelle souffrance cette étude est-elle susceptible de provoquer? Qu'est-ce qui pourrait faire empirer les choses?	Comment la souffrance sera-t-elle réduite au minimum?	
	Effets indésirables	Méthode et interventions	Points limites
Effets fondamentaux de la modification génétique	Toute modification génétique peut entraîner des effets cliniques néfastes. Lorsque ceux-ci sont imprévisibles, toute	Suivi continu en cage Évaluation du bien-être à des points définis du développement: naissance,	Les animaux seront euthanasiés en cas de dépassement d'une gravité modérée.

	<p>indication que les animaux modifiés se sont écartés des paramètres comportementaux ou physiques normaux (à savoir ceux connus pour se produire dans les phénotypes liés à la souche génétique de base et/ou dans les groupes de contrôle sauvages) pourrait dénoter un problème de bien-être.</p>	<p>sevrage et maturité sexuelle</p> <p>Suivant la nature des effets néfastes éventuellement détectés, des facteurs d'amélioration appropriés seront appliqués partout où c'est possible, avec notamment une révision des stratégies de reproduction ou un raffinement des conditions d'élevage (p. ex. plus de matériaux de nidification pour compenser une thermorégulation défailante).</p>	
<p>Prélèvement d'échantillons de tissus à des fins de génotypage</p>	<p>Douleur et/ou angoisse potentiellement provoquées par la méthode de prélèvement des échantillons, p. ex. perforation ou encochage des oreilles ou amputation de l'extrémité de la queue</p> <p>Une biopsie de la queue est généralement utilisée lorsque de grandes quantités d'ADN sont requises, mais peut provoquer des douleurs à court et à long terme (suite, dans ce dernier cas, à la formation d'un névrome).</p>	<p>Lorsque les animaux sont identifiés par encochage auriculaire, il est préférable, dans la mesure du possible, d'utiliser les tissus ainsi prélevés pour le génotypage.</p> <p>Dans le cas d'une amputation de l'extrémité de la queue, il convient de prélever le moins de tissus possible (en tenant toutefois compte du fait qu'il n'est absolument pas souhaitable de devoir procéder à un second prélèvement), des produits anesthésiants et analgésiques</p>	<p>Sans objet, étant donné que la procédure ne devrait être mise en œuvre qu'une seule fois et qu'il est peu probable que la douleur ou l'anxiété causée se situe à un niveau nécessitant une euthanasie.</p>

		<p>devraient le cas échéant être utilisés et tout saignement excessif devrait être rapidement traité.</p> <p>Le développement de techniques moins invasives devrait être suivi, évalué localement, et celles-ci devraient être mises en œuvre chaque fois que c'est possible.</p>	
Phénotypage	<p>Stress induit par la manipulation ou l'application du test phénotypique, p. ex. stress lié au fait d'être placé dans un environnement inconnu, administration de composés expérimentaux en vue de générer une réponse, suivi des infections, anesthésie, contrainte pour l'imagerie, etc.</p>	<p>Formation du personnel chargé du phénotypage à la manipulation et à l'observation compétente, empathique et standardisée</p> <p>Recours à des produits anesthésiants pendant l'imagerie ou la mise en œuvre de procédures douloureuses.</p> <p>Structuration des tests phénotypiques de manière à évoluer des moins invasifs (p. ex. observation du comportement dans un espace ouvert) aux plus invasifs (p. ex. procédures nécessitant une anesthésie)</p>	<p>Lorsqu'une mutation déclenche une réponse sévère à un test phénotypique, les points limites humains sont atteints, et les animaux euthanasiés.</p>

Le gène examiné est un nouveau mutant, avec des effets néfastes encore inconnus. L'expérience dans cet établissement a montré que la grande majorité des modèles analogues affichent généralement un phénotype léger. Toutefois, il peut arriver qu'un modèle présente des signes cliniques modérés et, dès lors, cet exemple devrait être rangé, à titre prospectif, dans la classe MODÉRÉE.

2.1.3 Résultats

Évaluation initiale chez les animaux nouveau-nés:

Couleur des petits (pour les nouveau-nés uniquement)	Normale
Activité des petits (pour les nouveau-nés uniquement)	Normale
Tâche de lait (pour les nouveau-nés uniquement)	Présente
Portée	Tous les petits sont conformes aux paramètres de la souche de base concernant la taille de la portée, l'homogénéité de la portée, le développement et la croissance des petits.

Les indicateurs suivants ont été observés 14 jours après la naissance et au sevrage:

Aspect général	Tous les petits présentent une morphologie «normale». Aucun signe de malformation n'a été observé.
Taille, conformation et croissance	Croissance normale suivant la courbe de croissance standard de la souche de base
État du pelage	Normal
Comportement – posture, démarche, activité et interactions avec l'environnement	Comportements et interactions normaux entre tous les animaux de la cage; aucune hyperactivité ni agressivité n'a été relevée.
Signes cliniques	Aucun détecté
Taille relative	Normale en comparaison avec la souche de base
Nombres	Le taux de mortalité pré-sevrage s'est révélé normal par rapport à la souche de base

Observations cliniques

Toutes les observations et ratios des nouveau-nés jusqu'au sevrage ont été jugés normaux en comparaison avec la souche génétique de base (C57BL/6N), avec une proportion mendélienne normale de souris homozygotes, hétérozygotes et sauvages nées.

À l'âge de quatre semaines, les souris des groupes de contrôle homozygote et sauvage (7+7) ont subi une batterie de tests d'observation et de procédures légères (SHIRPA, dysmorphologie, espace ouvert, chimie clinique du sang, DEXA et imagerie Faxitron), lesquels se sont poursuivis sur une période de 16 semaines. À la fin de cette expérimentation, l'analyse phénotypique a mis en évidence une baisse de l'élimination du glucose chez les souris

homozygotes après un test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale (ipGTT). Bien que l'élimination du glucose ait été réduite pendant le test, tous les animaux sont retournés à leur état basal après la procédure, et aucun autre effet néfaste n'a été constaté.

2.1.4 Analyse des résultats

Appréciation de la gravité réelle

Une fois la colonie établie, des souris hétérozygotes et des souris sauvages ont été utilisées pour son maintien et son développement. Aucun phénotype nuisible n'a été observé chez les souris utilisées aux fins de la reproduction et du maintien, et ceux-ci sont donc réputés n'avoir montré aucun effet néfaste. Étant donné qu'aucun phénotype nuisible n'est attendu, cette lignée pourrait donc être rendue homozygote et maintenue sans qu'une autorisation de projet soit nécessaire.

L'accouplement de souris hétérozygotes x hétérozygotes ci-dessus a produit des souris homozygotes. Un groupe de ces souris a été utilisé pour un phénotypage standard, se composant d'une série de protocoles légers, dont l'insertion d'une aiguille pour prélever des échantillons sanguins pendant le test de tolérance au glucose réalisé en i.p. Le groupe de contrôle sauvage a subi les tests simultanément. L'effet cumulé sur les souris aurait été léger, compte tenu des procédures de prélèvement d'échantillons sanguins et de phénotypage, par rapport à l'effet général de la modification génétique.

Synthèse

Reproduction et maintien – pas d'effets néfastes

Souris homozygotes et groupe de contrôle – LÉGÈRE – du fait des tests de dépistage (et non de l'effet de la modification génétique)

En résumé, cette lignée de souris génétiquement modifiées peut être considérée comme ayant un phénotype non nuisible. La reproduction de lignées établies ne nécessiterait pas d'autorisation de projet au titre de la directive.

2.2 Modèle de souris génétiquement modifiées – *Tg(GeneB)^{Labcode}*

2.2.1 Contexte général

Une colonie de souris porteuse d'une mutation générant une surexpression d'un transgène sera créée afin d'étudier une forme de cancer. La lignée sera créée dans une souche de base C57BL/6N. Toutefois, l'apparition et le rythme de développement des tumeurs ne peuvent pas être définis et nécessitent

une évaluation dans le cadre de la caractérisation du modèle. Une fois les lignées fondatrices établies, un test d'évaluation du bien-être de base sera effectué de la manière décrite à la section 2.1. La lignée la plus utile sera développée afin d'étudier ce type de leucémie.

2.2.2 Évaluation prospective

Quelles actions cette étude suppose-t-elle à l'égard des animaux?	Que ressentiront les animaux? Quelle souffrance cette étude est-elle susceptible de provoquer? Qu'est-ce qui pourrait faire empirer les choses?	Comment la souffrance sera-t-elle réduite au minimum?	
	Effets indésirables	Méthode et interventions	Points limites
Évaluation et du développement des tumeurs	<p>L'animal perdra du poids et son état se dégradera à mesure que le cancer se développera.</p> <p>Des œdèmes sous-cutanés peuvent causer un inconfort ou affecter le comportement, la posture ou la locomotion.</p>	<p>Les interventions se fonderont sur les observations quotidiennes, avec des critères tels que la perte de poids, la dégradation de la condition physique, la léthargie, etc.</p> <p>Observations quotidiennes et suivi de l'état de santé général et de la croissance tumorale</p>	<p>Les animaux reproducteurs et de réserve présentant des signes cliniques ne relevant pas des procédures expérimentales, comme une perte de poids de plus de 15 %, un pelage en mauvais état ou une léthargie, seront euthanasiés.</p> <p>Les animaux seront euthanasiés si la tumeur s'ulcère, si elle les empêche de se comporter, de se tenir ou de se déplacer normalement ou si elle dépasse un diamètre de 1,2 cm.</p> <p>Les animaux présentant des signes de</p>

	Les animaux peuvent être plus sensibles aux maladies, du fait d'un système immunitaire déprimé.		maladie intercurrente seront euthanasiés.
--	---	--	---

Le modèle étudié fera l'objet d'une mutation afin de créer la maladie génétique prévue. L'apparition de la maladie est difficilement prévisible, mais des signes cliniques peuvent être prédéfinis de manière à caractériser celle-ci. Une fois caractérisé, le modèle nécessiterait d'être maintenu afin de permettre son utilisation dans des études expérimentales ultérieures relatives à des traitements potentiels de ce type de cancer. Sur cette base, la classe appropriée pour cet exemple serait MODÉRÉE.

2.2.3 Résultats

Des évaluations du bien-être ont été réalisées comme indiqué à la section 2.2 ci-dessus. Aucune anomalie n'a été observée dans les grandes étapes du développement et de la croissance jusqu'à la maturité sexuelle. La colonie a été élargie avec des animaux de réserve et futurs reproducteurs qui ont été accouplés à partir de l'âge de dix semaines afin de maintenir la colonie et de produire de nouveaux animaux d'expérimentation. Tout au long de cette période, les animaux ont été suivis, et un développement tumoral a été observé à partir de la 18^e semaine chez 60 % des animaux porteurs de la mutation. L'évolution clinique de la maladie a duré entre quatre et six semaines, après quoi les animaux ont dû être euthanasiés.

2.2.4 Analyse des résultats

Appréciation de la gravité réelle

60 % des animaux porteurs de la mutation ont développé des tumeurs à partir de leur 18^e semaine de vie. La stratégie de reproduction consistait à accoupler les animaux à partir de dix semaines. Le potentiel des couples reproducteurs à développer des tumeurs a été jugé suffisant pour modifier les stratégies de reproduction et de maintien. Les couples reproducteurs ont dès lors été accouplés à partir de l'âge de six semaines, puis séparés à douze semaines. Les mâles reproducteurs ont été euthanasiés. Les femelles reproductrices et de réserve ont été suivies quotidiennement afin de détecter les premiers signes d'un développement tumoral. Les animaux qui n'ont pas été utilisés ou n'étaient pas nécessaires ont été euthanasiés avant l'apparition des premiers signes cliniques.

Synthèse

Animaux de moins de 18 semaines – aucun effet néfaste

Animaux de plus de 18 semaines développant des tumeurs – LÉGÈRE compte tenu des points limites cliniques précoces

Animaux de plus de 18 semaines développant des tumeurs et utilisés – LÉGÈRE ou MODÉRÉE suivant l'application des points limites cliniques

2.3 Modèle de souris génétiquement modifiées – *GeneC^{tm1a(Funding)Lab}*

2.3.1 Contexte général

Une colonie de souris présentant une mutation du *GeneC* ciblant une lignée de cellules souches embryonnaires dérivée de la souche de base C57BL/6N, avec un potentiel phénotypique connu, a été créée en vue de tester son comportement et sa mémoire. Ce modèle a été maintenu dans une souche de base définie (C57BL/6N). Une fois la transmission de la lignée germinale des souris G1 établie, un test d'évaluation de base du bien-être a été réalisé.

2.3.2 Évaluation prospective

Comme à la section 2.1, le gène étudié est un nouveau mutant. L'intention est d'utiliser le modèle dans le cadre d'études comportementales futures en vue d'évaluer l'efficacité de nouveaux composés pharmaceutiques. L'expérience dans cet établissement a montré que la grande majorité des modèles analogues affichent généralement un phénotype léger. Toutefois, il peut arriver qu'un modèle présente des signes cliniques modérés et, dès lors, cet exemple devrait être rangé, à titre prospectif, dans la classe MODÉRÉE.

2.3.3 Résultats

L'ensemble des observations et ratios a été jugé normal en comparaison avec la souche génétique de base (C57BL/6N) du modèle, avec une proportion mendélienne normale de souris homozygotes, hétérozygotes et sauvages nées.

À l'âge de quatre semaines, les souris homozygotes et le groupe de contrôle sauvage ont subi une batterie d'observations et de tests en vue d'évaluer leur apprentissage et leur mémoire. Ces tests ont été réalisés sur une période de dix semaines. À la fin de cette analyse phénotypique, aucun phénotype nuisible n'avait été observé. Le modèle a alors été utilisé pour tester l'efficacité de nouveaux composés pharmaceutiques.

La reproduction des souris hétérozygotes a produit des animaux homozygotes sains, présentant des performances reproductives analogues à celles de la souche de base. Pour réduire le nombre d'animaux, une stratégie de reproduction par accouplement d'homozygotes a été utilisée. Contrairement à la stratégie d'origine, dans laquelle des souris homozygotes avaient été obtenues au départ de couples hétérozygote x hétérozygote, le nouveau groupe d'animaux homozygotes dérivés de parents homozygotes a semblé chétif et n'est pas parvenu à atteindre la taille et le poids des autres animaux.

Bien que l'idée ait initialement été de tester le comportement et la mémoire de ces animaux, d'autres analyses ont été réalisées sur les tissus et le sang obtenus de ceux-ci. Lors de l'analyse des résultats de la biochimie du sang et après consultation de la littérature, le *GeneC* s'est révélé être une protéine transporteuse essentielle qui se lie à la vitamine B12. La suppression du *GeneC* a résulté dans une rupture du mécanisme de transport extracellulaire, conduisant à une défaillance de la synthèse de l'ADN et du métabolisme des lipides et des protéines. L'effet de cette mutation n'aurait pas été observé chez des souris nées d'une femelle hétérozygote, étant donné que la source maternelle de vitamine B12 est transférée *in utero* au fœtus en développement via le placenta. Les premiers animaux porteurs de la répression de ce gène possédaient donc des réserves suffisantes de vitamine B12 pour survivre et prospérer jusqu'à l'âge de 16 semaines au moins, avec une reproduction et une fécondité normales en comparaison avec la souche de base.

2.3.4 Analyse des résultats

Appréciation de la gravité réelle

Cet exemple démontre que le maintien d'une colonie peut avoir un effet profond et souvent inattendu sur les souris. Sur la base des informations disponibles et des résultats de la reproduction et du phénotypage primaires, cette colonie n'aurait pas semblé remarquable. Logiquement, maintenir une colonie sur la base d'une stratégie de reproduction homozygote devrait garantir qu'un nombre minimum d'animaux soient engendrés, ce qui est souhaitable en vue de limiter l'utilisation d'animaux. Des phénotypes nuisibles imprévus peuvent se manifester dans des lignées jusque-là maintenues avec toutes les apparences de la normalité, sans autorisation de projet. En conséquence des effets néfastes pour le bien-être des animaux révélés par cet exemple, ce modèle devrait être ramené sous la procédure d'autorisation de projet, si ce type de stratégie de reproduction était appliqué.

Synthèse

Reproduction et maintien via des couples hétérozygotes – pas d'effets néfastes

Reproduction et maintien via des couples homozygotes – gravité MODÉRÉE pour les petits de cette génération, du fait d'un retard staturo-pondéral persistant

Exemple 2.3 – Les résultats soulignent la nécessité, pour les instituts, d'échanger des données précises et utiles, par exemple sous la forme d'un «passeport souris», lorsque des phénotypes néfastes sont susceptibles de se manifesterⁱ.

ⁱ Groupe de travail «passeports pour les animaux génétiquement modifiés» de la RSPCA (2010), *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, UK: RSPCA (disponible au téléchargement, en anglais, à l'adresse <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>)

COMMENT PRENDRE CONTACT AVEC L'UNION EUROPÉENNE?

EN PERSONNE

Dans toute l'Union européenne, des centaines de centres d'information Europe Direct sont à votre disposition. Pour connaître l'adresse du centre le plus proche, visitez la page suivante: https://europa.eu/european-union/contact_fr

PAR TÉLÉPHONE OU COURRIER ÉLECTRONIQUE

Europe Direct est un service qui répond à vos questions sur l'Union européenne. Vous pouvez prendre contact avec ce service:

- par téléphone:
 - via un numéro gratuit: **00 800 6 7 8 9 10 11** (certains opérateurs facturent cependant ces appels),
 - au numéro de standard suivant: **+32 22999696**;
- par courrier électronique via la page https://europa.eu/european-union/contact_fr

COMMENT TROUVER DES INFORMATIONS SUR L'UNION EUROPÉENNE?

EN LIGNE

Des informations sur l'Union européenne sont disponibles, dans toutes les langues officielles de l'UE, sur le site internet Europa à l'adresse https://europa.eu/european-union/index_fr

PUBLICATIONS DE L'UNION EUROPÉENNE

Vous pouvez télécharger ou commander des publications gratuites et payantes à l'adresse <https://publications.europa.eu/fr/publications>. Vous pouvez obtenir plusieurs exemplaires de publications gratuites en contactant Europe Direct ou votre centre d'information local (https://europa.eu/european-union/contact_fr).

DROIT DE L'UNION EUROPÉENNE ET DOCUMENTS CONNEXES

Pour accéder aux informations juridiques de l'Union, y compris à l'ensemble du droit de l'UE depuis 1952 dans toutes les versions linguistiques officielles, consultez EUR-Lex à l'adresse suivante: <http://eur-lex.europa.eu>

DONNÉES OUVERTES DE L'UNION EUROPÉENNE

Le portail des données ouvertes de l'Union européenne (<http://data.europa.eu/euodp/fr>) donne accès à des ensembles de données provenant de l'UE. Les données peuvent être téléchargées et réutilisées gratuitement, à des fins commerciales ou non commerciales.

