

**ETUDE COMPARATIVE DE 3 PROTOCOLES
ANESTHESIQUES KETAMINE/XYLAZINE ;
KETAMINE/MEDETOMIDINE/ATIPAMEZOLE ET
PROPOFOL/FENTANYL SUR 3 SOUCHES DE SOURIS
DE LABORATOIRE SWISS, BALB/C ET C57BL/6J**

THESE

pour le

diplôme d'Etat de

DOCTEUR VETERINAIRE

Présentée et soutenue publiquement

le 27 novembre 2020

devant

la Faculté de Médecine de Nantes

par

Audrey Marie BOUR

Née le 17 août 1994 à Ermont (95)

JURY

Président : Monsieur Bertrand ROZEC
Professeur de la Faculté de Médecine de Nantes

Enseignant rapporteur : Monsieur Jean-Claude DESFONTIS
Professeur à Oniris

Enseignant assesseur : Madame Gwenola TOUZOT-JOURDE
Maitre de Conférence à Oniris

**ETUDE COMPARATIVE DE 3 PROTOCOLES
ANESTHESIQUES KETAMINE/XYLAZINE ;
KETAMINE/MEDETOMIDINE/ATIPAMEZOLE ET
PROPOFOL/FENTANYL SUR 3 SOUCHES DE SOURIS DE
LABORATOIRE SWISS, BALB/C ET C57BL/6J**

THESE

pour le

diplôme d'Etat de

DOCTEUR VETERINAIRE

Présentée et soutenue publiquement

le 27 novembre 2020

devant

la Faculté de Médecine de Nantes

par

Audrey Marie BOUR

Née le 17 août 1994 à Ermont (95)

JURY

Président : Monsieur Bertrand ROZEC

Professeur de la Faculté de Médecine de Nantes

Enseignant rapporteur : Monsieur Jean-Claude DESFONTIS

Professeur à Oniris

Enseignant assesseur : Madame Gwenola TOUZOT-JOURDE

Maitre de Conférence à Oniris

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment		
Responsable : Hervé POULIQUEN - adjoint : Emmanuel JAFFRES		
Nutrition et endocrinologie	Patrick NGuyen* (Pr)	
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude Desfontis (Pr) Yassine Mallem (Pr) Antoine Rostang (MCC)	Martine Kammerer (Pr) Hervé Pouliquen* (Pr)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie Bach (Pr) Lionel Martignat (Pr)	Julie Herve (MC) Grégoire Mignot (MC)
Histologie et anatomie pathologique	Jérôme Abadie* (MC) Laetitia Jaillardon* (MC)	Marie-Anne Colle* (Pr) Frédérique Nguyen* (MC)
Pathologie générale, microbiologie et immunologie	François Meurens (Pr) Jean-Louis Pellerin* (Pr)	Emmanuelle Moreau (MC HDR) Hervé Sebbag (MC)
Biochimie alimentaire industrielle	Clément Cataneo (MC) Laurent Le Thuaut (MC) Thierry Serot (Pr)	Joëlle Grua (MC) Carole Prost (Pr) Florence Texier (MC)
Microbiotech	Géraldine Boue (MC) Emmanuel Jaffres (MC) Raouf Tareb (MCC) Bénédicte Sorin (IE)	Nabila Haddad (MC) Mathilde Mosser (MC) Hervé Prevost (Pr)
Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique		
Responsable : Alain CHAUVIN - adjoint : Raphaël GUATTEO		
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel Cappelier* (Pr) Michel Federighi (Pr) Catherine Magras* (Pr) Fanny Renois -Meurens (MC)	Eriic Dromigny (MC HDR) Bruno Le Bizec (Pr) Marie-France Pilet(Pr)
Médecine des animaux d'élevage	Sébastien Assie* (MC) Isabelle Breyton (MC) Alain Douart* (MC) Mily Leblanc Maridor (MC) Anne Relun (MCC)	Catherine Belloc* (Pr) Christophe Chartier* (Pr) Raphaël Guatteo* (Pr)
Parasitologie, aquaculture, Faune sauvage	Albert Agoulon (MC) Ségolène Calvez (MC) Nadine Ravinet (MC)	Suzanne Bastian (MC) Alain Chauvin* (Pr)
Maladies réglementées, zoonoses et réglementation sanitaire	Carole Peroz (MC)	Nathalie Ruvoen* (Pr)
Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie Bareille* (Pr) Christine Fourichon* (Pr HDR) Henri Dumon* (Pr) Lucile Martin (Pr)	François Beaudreau* (Pr) Aurélien Madouasse (MC) Nora Navarro-Gonzalez (MCC)

Département DSC Sciences Cliniques		
Responsable : Catherine IBISCH – adjoint : Olivier GAUTHIER		
Anatomie comparée	Eric Betti (MC) Claude Guintard (MC)	Claire Douart (MC)
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric Aguado (MC HDR) Eric Goyenvalle (MC HDR) Caroline Tessier* (MC)	Olivier Gauthier (Pr) Béatrice Lijour (MC) Gwénola Touzot-Jourde* (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Patrick Bourdeau* (Pr)	Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Nora Bouhsina (MCC) Anne Courouze* (Pr) Amandine Drut* (MC) Catherine Ibisch (MC) Odile Senecat (MC)	Nicolas Chouin (MC) Jack-Yves Deschamps (Pr) Marion Fusellier-Tesson (MC) Françoise Roux* (Pr)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Djemil Bencharif (MC HDR) Jean-François Bruyas* (Pr)	Lamia Briand (MC HDR) Francis Fieni* (Pr)
Département GPA Génie des Procédés Alimentaires		
Responsable : Olivier ROUAUD - adjoint : Sébastien CURET-PLOQUIN		
Lionel Boillereaux (Pr) Marie De Lamballerie (Pr) Francine Fayolle (Pr) Vanessa Jury (MC) Alain Lebail (Pr) Jean-Yves Monteau (MC HDR) Laurence Pottier (MC) Cyril Toublanc (MC)	Sébastien Curet Ploquin (MC) Dominique Della Valle (MC HDR) Michel Havet (Pr) Emilie Korbel (MCC) Catherine Loisel (MC) Olivier Rouaud (Pr) Eve-anne Norwood (MCC)	
Département MSC Management, Statistiques et Communication		
Responsable : Michel SEMENOU - adjoint Pascal BARILLOT		
Mathématiques, statistiques, Informatique	Véronique Cariou (MC) El Mostafa Qannari (Pr) Chantal Thorin (Pr AG.)	Philippe Courcoux (MC) Michel Semenu (MC) Evelyne Vigneau (Pr)
Economie, gestion	Pascal Barillot(MC) Florence Beaugrand (MC) Sonia EL Mahjoub (MC) Samira Rousseliere (MC)	Ibrahima Barry (MCC) Sibylle Duchaine (MC) Jean-Marc Ferrandi (Pr)
Langues et communication	Marc Bridou (PLPa) David Guyler (ens. cont.) Shaun Meehan (ens. cont.)	Franck Insignares (IE) Linda Morris (PCEA)

BTs : **Laurence Freret (PCEA)** Christophe Caron (PLPA), Pascale Fleury(PCEA), Virginie Magin (Ens. Cont.), Françoise Brichet (IAE).

Professeurs émérites : Poncelet

guide de lecture des tableaux suivants :Pr : Professeur, Pr. AG : Professeur agrégé. MC : maître de Conférences, MCC : MC contractuel, PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole, IE : Ingénieur d'Etudes ; IAE : Ingénieur de l'Agriculture et de l'Environnement ; ens. cont.: enseignant contractuel; HDR : Habilité à Diriger des Recherches

* Vétérinaire spécialiste d'une spécialité européenne, américaine ou française

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée en incluant les éléments bibliographiques suivants :

- Nom et Prénom de l'auteur : Audrey Bour
- Année de soutenance : 2020
- Titre de la thèse : Etude comparative de 3 protocoles anesthésiques kétamine/xylazine ; kétamine/médétomidine/atipamézole et propofol/fentanyl sur 3 souches de souris de laboratoire SWISS, Balb/c et C57BL/6J
- Intitulé du diplôme : thèse de doctorat vétérinaire
- Université de soutenance : Faculté de Médecine de Nantes
- Ecole de soutenance : Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique
- Nombre de pages : 130 p.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Bertrand Rozec

De la Faculté de Médecine de Nantes

Pour nous faire l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse

Sincères remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Claude Desfontis

Qui m'a aidé dans ce projet de thèse, sa relecture, sa finalisation et m'a permis de suivre la formation de niveau I concepteur en expérimentation animale

Je vous remercie

A Madame Gwenola Touzot-Jourde, Maître de Conférence

Qui m'a enseigné les bases de l'anesthésie pendant ma scolarité et me fait l'honneur d'être membre du jury

Sincères remerciements

Au Docteur Marie Liabeuf

Que j'avais rencontré lors d'un stage de première année et sans qui je n'aurais pas rédigé toutes ces pages sur les anesthésies chez la souris de laboratoire ! J'espère avoir pu aider la recherche animale à mon échelle. Je suis ravie d'avoir croisé ta route.

Bonne continuation pour la suite et plein de réussite pour ta vie professionnelle et personnelle

A Marie-Aude Cheminant

Pour m'avoir épaulée durant 1 mois dans les manipulations pratiques et m'avoir aidé pour tous les aspects de terrain : la réalisation et le contrôle des anesthésies. Ses connaissances sur les rongeurs de laboratoire fut précieuse.

Merci pour cette bonne humeur et ce professionnalisme. # Bouboule !

A Madame Thorin

Pour son aide très précieuse dans l'analyse statistique.

Merci beaucoup

Papa, Maman,

Je vous remercie pour m'avoir accompagnée depuis toute petite dans toutes mes décisions plus ou moins faciles, d'avoir façonné ainsi ma personnalité et de me permettre d'être moi tout simplement. Aucun mot ne peut résumer tout votre investissement personnel pour que je puisse être une Docteur vétérinaire !

Merci Papou pour m'avoir fait réfléchir sur la nécessité de faire 5/2 en balançant une phrase anodine il y a maintenant 6 ans mais pleine de sens « parfois dans la vie, il faut réaliser ses rêves ». Ce jour-là, elle n'est pas passée dans l'oreille d'une sourde...

Merci Maman de m'avoir indiquée qu'être vétérinaire c'est un joli métier (tu me sembles être bien placée !) mais avec des études difficiles et longues. Comme quoi, la vérité sort aussi de la bouche des parents....

Je vous aime plus que tout même si je ne le dis pas assez souvent. Vous êtes géniaux. Votre présence dans les moments d'incertitude me sera toujours indispensable.

A **Marion**, 'Gigi', ma petite sœur complice. Au final, nous avons étudié la médecine mais pour des espèces différentes ; ravie que tu aies trouvée ta voie de kinésithérapeute. Gardons contact malgré les kilomètres qui nous séparent. Bisous

A mon frerot **Guillaume** qui m'a rejoint sur Nantes pour ses études, est peu bavard mais bon c'est un garçon... Bon vent pour le reste frangin, le plus dur est derrière toi (quoi que..) !

A **mes grands-parents** : Francine, Mauricette et Christian qui disent toujours être fiers de leurs 3 petits-enfants, aujourd'hui c'est moi qui suis fière d'avoir des 'papys et mamies' comme vous, toujours prêts à m'écouter et me conseiller malgré la distance. Vous avez le recul de la vie que je n'ai pas encore...Voilà on peut le dire, j'ai réussi à trouver ma voie.

Et toi papy Bon qui certes nous a quittés il y a plusieurs années mais qui m'a accompagnée petite dans mon amour pour les animaux. Et toi Philippe, mon oncle atypique, je ne t'oublie pas car je reste ouverte sur la différence.

A **Lou**, qui m'accompagne depuis presque 3 ans maintenant et vit mon quotidien (ou le supporte je ne sais pas trop !) d'étudiante véto puis de jeune vétérinaire. A nous de rédiger les prochaines années de notre vie ; restons motivés et patients pour construire un cocon qui nous ressemble.

A **Maki**, mon chien qui même s'il n'est pas parfait (un croisé border hyperactif plus ou moins à l'écoute) met de la joie dans les moments difficiles et le quotidien. Une acquisition due à un coup de sang de ma part qui m'en a appris beaucoup sur l'espèce canine !

A **Amandine, Claire, Marie, Mathilde, MPP, Liv, Tom** (j'ai mis par ordre alphabétique les copains car loin de moi l'envie de classer vos prénoms !) pour m'avoir supportée en 4A et en 5A, épaulée si besoin, et avec qui j'ai partagé le stress, la bonne humeur, les mauvaises passes du quotidien d'étudiant et de futurs professionnels, de la vie privée ou du boulot. Je vous souhaite plein de réussite et de bonheur dans vos projets futurs plus ou moins proches privés ou professionnels. Merci pour les quelques soirées bouffe et Radioragots faites avec vous. Des bisous ! J'espère garder contact le plus longtemps possible.

A tous les maîtres de stage et vétérinaires qui m'ont fait découvrir diverses facettes de mon joli métier de vétérinaire, merci de ne pas avoir fermé mon esprit.

A **Carole Peroz**, ma tutrice pendant mes 5 ans à Oniris, qui m'a toujours aidée en cas de besoin (surtout pour ce fameux stage à l'étranger !) et a toujours répondu à mes questions. Je suis ravie d'avoir croisé votre chemin !

A ma **belle-famille** qui fait à présent partie de mon quotidien et accepte une amoureuse des animaux dans leur entourage. Petite pensée pour Jean Luc qui ne pourra pas lire mon roman (peut-être ne rates-tu pas grand-chose au final, c'est peut-être un brin soporifique !)

Je ne peux pas oublier certains camarades de prépa avec qui j'ai toujours contact mais que je ne vois pas souvent, et ces quelques années de galère où la bonne humeur permettait de pallier les difficultés. On a réussi !!

Aux quelques vétérinaires qui m'ont permis de me lancer en clientèle canine et me f(er)ont confiance pour la suite.

Merci à tous de me permettre d'être (enfin) Docteur Vétérinaire !

Table des matières

Première partie : Synthèse bibliographique

Table des matières.....	13
Introduction	
Tables des Annexes	
Liste des Tableaux	
Liste des Figures	
Liste des Abréviations et des Sigles	
I. Le dispositif législatif.....	29
A. La réglementation européenne.....	29
B. Les réglementations françaises.....	29
1. Historique (Sonia Canselier, 2015).....	29
2. Fonctionnement des Etablissements d'expérimentation animale (<i>Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques ; Arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles</i>).....	30
a) Agrément des Etablissements (Articles 1 et 2).....	30
b) Normes d'hygiène, soins et hébergement des animaux (Annexe II).....	30
c) Traçabilité (Articles 6 et 7).....	30
d) Contrôles et sanctions (Article 5).....	31
3. Composition et formation du personnel (<i>Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques</i>).....	31
4. Autorisation des projets scientifiques utilisant des modèles animaux (<i>Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales, chapitre II</i>).....	32
5. Notion d'éthique et de bien-être animal.....	32
a) La prise en compte du bien-être animal : la règle des 3R.....	33
b) Structures chargées du bien-être animal (SBEA).....	34
c) Organisation et rôles des Comités d'Ethique en Expérimentation Animale (CEEA) (<i>Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales, chapitre I^{er}</i>).....	34
Pour Conclure :	35
C. Usage des espèces concernées par l'expérimentation animale en France : exploitation des enquêtes statistiques d'utilisation des animaux à des fins scientifiques menées par le MESRI.....	35
1. La place de l'animal dans l'expérimentation.....	35
2. Les espèces utilisées en France.....	35
a) Rongeurs et Lagomorphes.....	38
b) Poissons.....	38

c)	Mammifères	38
d)	Cas particuliers des primates.....	39
e)	Oiseaux	39
f)	Autres espèces.....	40
	Pour Conclure :	40
D.	Diminuer le nombre d’animaux voués à la recherche et améliorer leur cadre de vie : un enjeu sociétal	40
a)	Usage raisonné des animaux de laboratoire : « reduce »	40
b)	La nécessité de développer des méthodes alternatives : « replace ».....	40
c)	Confort de vie des animaux : « refine ».....	41
d)	Point de vue du grand public.....	41
e)	Option de seconde vie pour les animaux de laboratoire	41
	II. La souris de laboratoire	41
A.	Généralités.....	41
1.	Point de vue historique et usage moderne	41
2.	Classification et génétique	42
3.	Quelques données sur la souris à l’état sauvage (Danneman <i>et al</i> , 2013).....	42
4.	Adaptation de la vie en laboratoire de la souris (<i>Annexes de l’Arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d’agrément, d’aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d’animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles</i>).....	43
a)	Hébergement.....	43
b)	Alimentation et prise de boisson.....	44
c)	Enrichissement et bien-être animale (Gilbert, 2020)	44
d)	Hygiène et contrôles sanitaires (Inserm, 2009).....	45
e)	Gestion de la fin de vie	46
B.	Les différentes souches utilisées dans l’étude	46
1.	Etablissements éleveurs ou fournisseurs de rongeurs.....	46
2.	Vocabulaire et nomenclature (Institut Pasteur, consultée le 10/04/2020))	46
3.	Lignées consanguines	47
a)	Définition (Institut Pasteur, consultée le 10/04/2020)	47
b)	C57Bl/6J (Janvier Labs ; The Jackson Laboratory, consultés le 11/04/20)	48
c)	Balb/c.....	49
4.	Lignée non consanguine : la SWISS	49
	III. Anesthésie des souris de laboratoire	50
A.	Les différentes voies d’administration : avantages et inconvénients	50
1.	L’anesthésie gazeuse	50
a)	Usage et avantages.....	50
b)	Matériel spécifique.....	51
2.	Les voies parentérales	53
a)	La voie intra-péritonéale (IP)	53
b)	La voie intraveineuse (IV)	54

c) La voie intra-musculaire (IM).....	55
d) La voie sous cutanée (SC)	55
e) Conclusion sur les voies parentérales.....	55
B. Les différentes molécules utilisables en anesthésie et leur impact sur l'organisme	56
1. Les anticholinergiques	56
a) L'atropine.....	56
b) Le glycopyrrolate	57
2. Les tranquillisants majeurs ou neuroleptiques	57
a) Les phénothiazines	57
b) Les butyrophénones	57
3. Les sédatifs analgésiques ou alpha2 agonistes	57
4. Les tranquillisants mineurs ou benzodiazépines.....	58
5. Les molécules d'induction	58
a) Les agents dissociatifs.....	58
b) Le propofol (P)	58
c) L'alfaxalone.....	58
d) L'étomidate et le métomidate.....	58
6. Les barbituriques	58
7. Les agents anesthésiques gazeux : les gaz halogénés	59
8. Les analgésiques	60
a) Les anesthésiques locaux.....	60
b) Les opioïdes	60
c) Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	62
Pour conclure :	63
C. Les combinaisons d'anesthésiques utilisées chez la souris de laboratoire	63
1. Association comprenant la kétamine	63
a) Kétamine/ xylazine et acépromazine	63
b) Kétamine/ médétomidine et usage de l'atipamézole	64
c) Kétamine et benzodiazépines.....	65
2. Association tilétamine/ zolazépam	65
3. Association alfaxalone/ xylazine.....	65
4. Inclusion des opioïdes	65
a) Exemple de neuroleptanalgie : fentanyl/ fluanisone.....	65
b) Association propofol/ fentanyl	65
c) Pré-médication à la buprénorphine	66
d) Autres protocoles testés.....	66
D. Notion de wash-out	67
E. Réglementation de la pharmacie vétérinaire et usage des stupéfiants dans les établissements d'expérimentation animale (Arrêté du 1 ^{er} février 2013 relatif à la délivrance et à l'utilisation de médicaments employés par les établissements agréés en tant qu'utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques).....	67

1.	La cascade vétérinaire	67
2.	Conditions d'acquisition, de détention et d'usage.....	68
3.	Rôle de la personne responsable de la pharmacie.....	68
4.	Particularités des molécules stupéfiantes.....	68
F.	Paramètres de monitoring chez les rongeurs.....	70
1.	Température.....	70
2.	Appareil respiratoire.....	71
a)	Une évaluation clinique simple de la fonction respiratoire	72
b)	L'oxymétrie de pouls	72
c)	La capnographie.....	72
d)	Les gaz sanguins.....	73
3.	Appareil cardio-vasculaire	73
a)	Fréquence cardiaque	73
b)	Electrocardiographie	73
c)	Pression artérielle.....	74
4.	Evaluation de la profondeur de l'anesthésie.....	74
a)	Théorie de la profondeur anesthésique	74
b)	Comment l'évaluer en pratique ?.....	75
I-	Contexte et objectifs.....	77
A.	Contexte de l'étude (Bouchaud).....	77
B.	Objectifs de cette étude	78
II-	Matériels et méthodes	79
A.	Animaux.....	79
1.	Choix des animaux.....	79
2.	Détails des lots.....	80
3.	Provenance et hébergement.....	80
B.	Organisation des anesthésies	81
a)	Protocoles et posologies retenus et technique d'administration	81
b)	Etablissement du planning	82
C.	Coût des animaux et des anesthésiques	83
D.	Suivi per- et post-anesthésique	83
1.	Monitorer l'anesthésie : création d'une fiche de suivi de l'anesthésie.....	84
2.	Suivi entre les anesthésies.....	87
E.	Obligation réglementaire : Rédaction de la demande d'autorisation de projet (voir annexe 1).....	87
F.	Traitements des données statistiques.....	87
III-	Résultats	88
A.	Apport de l'étude pilote	88
1.	Données qualitatives sur l'influence de chaque protocole	88
2.	Modifications du protocole KMA de l'étude principale : posologie et voie d'administration	89

3.	Modification de la fiche de suivi d'anesthésie (voir matériel et méthodes).....	89
B.	Influence de l'âge.....	89
C.	Influence du sexe.....	90
1.	Sur la fréquence respiratoire.....	90
2.	Sur le temps d'induction anesthésique.....	90
3.	Sur la durée d'anesthésie.....	91
D.	Interactions du protocole anesthésique et de la souche.....	92
1.	Sur la fréquence respiratoire.....	92
2.	Sur l'induction anesthésique.....	94
3.	Sur la durée anesthésique.....	94
4.	Sur la profondeur anesthésique.....	95
5.	Comportement post anesthésie.....	95
E.	Influence d'anesthésies répétées sur l'organisme.....	96
F.	Mortalité des souris.....	96
1.	Causes de mortalité ou d'euthanasie des souris de l'étude principale.....	96
2.	Devenir des souris du projet.....	97
	IV. Discussion.....	100
A.	Matériel et Méthodes.....	100
1.	Impact d'anesthésies répétées et périodes de wash-out.....	100
2.	Optimisation des lots.....	101
3.	Voies d'injection.....	101
4.	Subjectivité des manipulateurs.....	101
5.	Paramètres de monitoring et observations.....	102
6.	Influence du rythme circadien.....	102
7.	Ordre des animaux.....	103
B.	Résultats.....	103
1.	Durée des anesthésies et posologies des molécules.....	103
2.	Temps d'induction des anesthésies.....	104
3.	Profondeur anesthésique.....	104
4.	Influence du sexe sur l'anesthésie.....	105
5.	Influence de l'âge.....	105
6.	Influence de la souche.....	105
7.	Taux de mortalité.....	106
8.	Influence de l'anesthésie sur l'évolution pondérale.....	106

Conclusion

Bibliographie

Introduction

Lors d'un stage pendant ma scolarité, j'ai pu me rendre, quelques années auparavant, au sein de l'animalerie UTE-IRS de Nantes. Mon encadrante Marie Liabeuf m'a permis de découvrir l'expérimentation animale et l'organisation d'une animalerie hébergeant des rongeurs.

Lors de ma recherche d'un sujet de thèse, elle m'a proposée de me pencher sur les anesthésies de la souris de laboratoire. En effet, une des équipes travaillaient sur le modèle murin de l'asthme humain et endormaient tous leurs animaux pour réaliser des instillations intra-nasales, geste impossible sur animal vigile. L'essai d'un protocole à base de tilétamine/ zolazépam a entraîné le décès de plusieurs individus.

Le but de cette thèse est donc de pouvoir proposer un protocole adapté en termes de durée et de sûreté anesthésiques. Suite à cet incident, l'équipe de recherche s'était tournée vers un protocole traditionnel kétamine-xylazine, parfait comme association témoin.

Pour aller plus loin dans cette étude, nous avons comparé trois protocoles anesthésiques sur trois souches de souris de laboratoire différentes. La comparaison mâle/ femelle est également initiée.

Dans un premier temps, la réglementation française d'expérimentation animale est rappelée afin de délimiter le cadre dans lequel s'est déroulée cette thèse. Les molécules anesthésiques et protocoles déjà utilisés sur les souris de laboratoire sont présentés ainsi que les moyens de monitoring anesthésique possibles pour cette espèce. Dans un deuxième temps, le protocole expérimental est détaillé. Enfin les résultats obtenus sont exposés et discutés selon les données actuelles de la littérature scientifique.

Table des Annexes

Annexe 1 : Saisine de demande d'autorisation de projet

Annexe 2 : Critères cliniques démontrant une atteinte sévère de l'animal pouvant justifier une euthanasie accompagnant la demande d'autorisation de projet

Annexe 3 : Avis du Comité d'Ethique suite au formulaire de demande de projet

Annexe 4 : Autorisation de projet délivrée par le MESRI

Liste des Tableaux

Tableau I : Récapitulatif des fonctions du personnel d'Établissements d'expérimentation animale (Articles 2,3,4 et 5).....	31
Tableau II : Plan du formulaire de demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques	32
Tableau III : Effectif total des animaux utilisées en recherche en France entre 2014 et 2017. (Source : Enquêtes d'utilisation des animaux à des fins scientifiques 2014-2017, MESRI).....	35
Tableau IV : Réglementation des dimensions des cages hébergeant des souris (source : Annexe II de l'Arrêté du 1 ^{er} Février 2013).....	44
Tableau V : Méthodes d'euthanasie valables chez la souris de laboratoire (source : extrait de l'annexe IV de l'Arrêté du 1 ^{er} Février 2013)	46
Tableau VI : Récapitulatif des volumes administrables selon la voie d'injection pour une souris (Diehl et al., 2001)	56
Tableau VII : Récapitulatif des posologies, voies d'administration et effets des molécules sédatives chez la souris (modifié de Flecknell, 2016)	59
Tableau VIII : Comparaison des deux gaz halogénés isoflurane et sévoflurane (Flecknell, 2016 ; SBEA, 2018)	60
Tableau IX : Posologies, voies d'administration, durée d'action des opioïdes chez la souris (Flecknell, 2016 ; Med'Vet).....	62
Tableau X : Posologies des AINS utilisés chez la souris (Flecknell, 2016).....	63
Tableau XI : Posologies étudiées pour l'association kétamine/xylazine dans la littérature et leurs effets (ACP = acépromazine, CRI= constant rate infusion : perfusion à débit constant)	63
Tableau XII : Posologies pour l'association kétamine/ médétomidine /atipamézole dans la littérature.....	64
Tableau XIII : Résultats de l'article Intraperitoneal propofol and propofol fentanyl, sufentanil and remifentanil combinations for mouse anaesthesia (<i>Alves et al., 2007</i>).....	66
Tableau XIV : Classement réglementaire des substances vénéneuses utilisables en médecine humaine et vétérinaire évoquées dans la partie précédente (legifrance, consulté le 4/04/20).....	69
Tableau XV : Répartition des 13 souris de 6 semaines pour l'étude pilote pilote (KX : Kétamine + xylazine, PF : Propofol + fentanyl, KMA : Kétamine + xylazine + atipamézole)	80
Tableau XVI : Détail des lots de souris l'étude principale	80
Tableau XVII : Spécialités vétérinaires utilisés et détails des posologies retenues des différents protocoles anesthésiques (RCP des spécialités)	81
Tableau XVIII : Planning des anesthésies et ordre de passage des groupes (Définitions des groupes : Groupe A : 10 souris Balb/c ; Groupe B : 10 souris C57Bl/6J ; Groupe C : 10 souris SWISS)	82
Tableau XIX : Frais d'achat des souris provenant de Janvier Labs (Inserm, 2019).....	83
Tableau XX : Spécialités vétérinaires des anesthésiques utilisés et coût associé.....	83
Tableau XXI : Coût de l'anesthésie pour une souris pour chaque protocole (le sérum physiologique n'est pas inclus).....	83
Tableau XXII : Durée des anesthésies avec le protocole kétamine/ xylazine sur les 4 souris	88
Tableau XXIII : Récapitulatif des intervalles de confiance et de la moyenne du temps d'induction (en secondes) entre les mâles et femelles des différentes souches selon les 3 protocoles anesthésiques (source : R commander)	90
Tableau XXIV : Comparaison des moyennes des temps d'induction anesthésiques en secondes selon le sexe (source : Rcommander)	90

Tableau XXV: Moyenne des temps d'induction de chaque sexe toute souche confondue selon les 3 protocoles anesthésiques	91
Tableau XXVI : Comparaison des moyennes des temps d'anesthésie selon le sexe et la souche en secondes (source : Rcommander)	91
Tableau XXVII: Fréquences respiratoires des six groupes sous protocole KMA avant injection d'atipamézole et 10 minutes après	93
Tableau XXVIII: Recensement et cause des décès au cours de l'étude principale	96
Tableau XXIX : Récapitulatif des critères cliniques présents dans notre étude ayant justifiés une euthanasie	97
Tableau XXX: Récapitulatif des résultats précédents	Erreur ! Signet non défini.

Liste des Figures

Figure 1 : Diagramme de répartition des différentes espèces animales utilisées en recherche en France et les domaines d'utilisation en 2016 (source : GIRCOR, 2016).....	37
Figure 2 : Arbre phylogénétique des Primates (source : Green Facts, consulté le 10/04/20)	39
Figure 3 : Photographie de 2 souris SWISS de 13 semaines, le mâle à gauche et la femelle à droite.	43
Figure 4 : Répartition du budget temps de la souris de laboratoire (source: Gilbert, 2020).....	45
Figure 5 : Schéma des 4 types de croisement génétiques possibles pour un gène avec deux allèles A et a (source : Jaubert).....	47
Figure 6 : Graphique donnant la fréquence d'apparition de chaque croisement précédemment défini dans la figure 4 au cours des générations (source : Jaubert)	48
Figure 7 : Evolution du pourcentage du génome à l'état hétérozygote au cours des générations d'une lignée consanguine (source : Jaubert).....	48
Figure 8 : Courbe pondérale de la Black 6 (source : Janvier Labs)	49
Figure 9 : Graphique de la croissance pondérale d'une souris de souche Balb/c (source : Janvier Labs)	49
Figure 10 : Graphique de la courbe de poids de la souche SWISS (source : Janvier Labs).....	50
Figure 11 : Photographie d'un poste à anesthésie TEC3 de chez TEM SEGA® pour rongeurs (source : J. Drochon, responsable technique de l'Unité Technique Expérimentale, Nantes).....	51
Figure 12 : Boîtes à induction anesthésique pour petits animaux (source : VetTech UK, consulté le 25/03/20).....	51
Figure 13 : Exemple de masque pour souris (Danneman et al, 2013)	52
Figure 14 : Kit d'intubation des rats et souris (source : Kent Scientific, consulté le 25/03/20)	52
Figure 15 : Photographie des organes abdominaux de la souris (Uysal et al., 2017)	53
Figure 16 : Localisation radiographique après injection IP chez des souris d'un produit de contraste (ethidol) Localisation abdominale et dans l'espace péri-testiculaire (A), rétropéritonéale (B), intestinale (C), intravasculaire (D) (Steward et al., 1968).....	54
Figure 17 : Photographie montrant la zone conseillée d'injection pour la voie intrapéritonéale soit le cadran abdominal droit (Flecknell, 2016).....	54
Figure 18 : Exemples de dispositifs de cathétérisation avec accès bouton à gauche, harnais de maintien d'un cathéter sur un mannequin de souris au centre (source : PHYMEP, consulté le 10/04/20) et port d'un tail cuff à droite (source : Charles River, consulté le 20/03/20).....	55
Figure 19 : Schéma du principe d'un dispositif pour pléthysmographie (Hamelmann et al., 1997).....	71
Figure 20 : Courbe normale du CO2 expiré au cours du temps (Bound Tree, consulté le 10/04/20).....	72
Figure 21 : Dispositif ECGenie (Mouse Specifics, consulté le 10/04/20).....	73
Figure 22 : Signes de Snow (SBEA, 2018)	74
Figure 23 : Photographie des 3 souris femelle à 13 semaines d'âge en vue dorsale de chaque souche de l'étude .	79
Figure 24 : Illustration de la contention de la souris et de l'injection intra-péritonéale sur une souris Balb/c mâle	82
Figure 25 : Disposition des 5 souris d'un sexe donné et d'une souche donnée anesthésiées sur tapis chauffant en décubitus dorsal, chacune associée à une petite cage de logement avant et après l'anesthésie	84
Figure 26 : Illustration de réalisation des 3 réflexes cutané, podal et caudal de gauche à droite sur une souris C57Bl/6J femelle	85
Figure 27 : Fiche de suivi d'anesthésie individuelle établie pour l'étude principale, révisée suite à l'étude pilote..	86
Figure 28 : Graphique illustrant la durée des 3 anesthésies selon la souche et le sexe (en bleu les mâles et en orange les femelles).....	92
Figure 29 : Graphique donnant les moyennes des fréquences respiratoires de chaque groupe avec le protocole KMA de To à 10 minutes après injection d'atipamézole	93

Figure 30: Graphique donnant l'évolution pondérale moyenne des mâles et des femelles de chaque souche au cours du temps96

Table des Abréviations et des Sigles

A	: atipamézole
ACP	: acépromazine
AINS	: anti-inflammatoire non stéroïdien
ANSM	: Agence Nationale de sécurité du Médicament
Anses	: Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ASA	: American Society of Anesthesiologists
bts/min	: battements par minute
cm	: centimètre
cm ²	: centimètres carré
CNREEA	: Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale
CO ₂	: dioxyde de carbone
CR	: Code Rural et de la pêche maritime
CSP	: Code de la Santé Publique
DASRI	: Déchets d'Activités de Soins à Risques Infectieux
EtCO ₂	: end-tidal CO ₂ soit la concentration maximale de CO ₂ en fin d'expiration
ECG	: électrocardiogramme
ECVAM	: European Centre for the Validation of Alternative Methods
F	: fentanyl
FAWC	: Farm Animal Welfare Committee
gr	: gramme
HDM	: House Dust Mite
kcal	: kilocalorie
K	: kétamine
KMA	: kétamine/ médétomidine/ atipamézole
KX	: kétamine/ xylazine
IM	: intra-musculaire
IP	: intra-péritonéale
IV	: intra-veineuse
min	: minutes
ml	: millilitre
mmHg	: millimètre de mercure
mvts/min	: mouvements par minute
M	: médétomidine
MAC	: concentration alvéolaire minimale
MESRI	: Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation (ancien MENESR)
NaCl	: chlorure de sodium
NDV	: nom déposé vétérinaire
OGM	: organisme génétiquement modifié
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
P	: propofol

PA : pression artérielle
PF : propofol / fentanyl
PNH : primate non humain
RCP : résumé des caractéristiques du produit
S : sérum physiologique
SBEA : structure chargée du bien-être animal
SC : sous-cutanée
SPA : Société Protectrice des Animaux
Th2 : lymphocyte T helper 2
UE : Union Européenne
X : xylazine
 μg : microgramme

Première partie : Synthèse bibliographique

I. Le dispositif législatif

A. La réglementation européenne

La législation européenne de l'expérimentation animale repose sur la Convention STE 123 (Convention Européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques) rédigée par le Conseil de l'Europe en 1985. Cette convention vise la baisse du nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques, un usage structuré et justifié des animaux lorsqu'ils sont nécessaires et le développement des méthodes alternatives.

La première Directive européenne 86/609 pour la protection des animaux dans le cadre de la recherche découle de cette Convention et vise l'harmonisation des pratiques au sein des Etats membres. Cependant, à cause de sa transcription, chaque pays n'exerce pas les mêmes contraintes en expérimentation animale. La Directive de 1986 est donc revue en 2010 avec l'émission de la Directive européenne 2010/63. Le concept des 3R : « refine, reduce and replace » est le fondement de toute cette réglementation (Inserm, consulté le 11/04/20).

Sont concernés les animaux vertébrés, leurs formes larvaires ou embryonnaires évoluées et les céphalopodes. Cette Directive indique également les secteurs scientifiques impliqués : la recherche fondamentale, la santé des hommes, des animaux et des plantes, la recherche agronomique, la protection de l'environnement, la conservation des espèces, l'enseignement supérieur ou technique et les enquêtes médico-légales.

La détention des animaux, leur flux et leur usage doivent être justifiés puis validés scientifiquement et éthiquement. Le degré de gravité de toute étude doit également être évalué (GIRCOR, consulté le 31/03/20).

B. Les réglementations françaises

Les lois françaises relatives à l'usage d'animaux vivants à des fins scientifiques sont inscrites dans le livre II du Code Rural et de la pêche maritime (CR), dans les articles R-214-87 à R-214-137. Ces textes réglementaires sont sous l'autorité du Ministère de l'Agriculture et du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) car des organismes transgéniques sont impliquées.

1. Historique (Sonia Canselier, 2015)

En 1791, le Code Pénal considère l'empoisonnement des animaux d'autrui comme crime (La protection juridique des animaux, consultée le 04/10/20). La notion de protection animale est ajoutée dans la législation en France le 2 juillet 1850 : la loi Grammont punit pénalement (« amende de cinq à quinze francs » et « un à cinq jours de prison ») tout acte cruel envers un animal domestique dans un lieu public. En 1959, soit plus de cent ans plus tard, le Décret n°59-1081 étend l'application de la loi Grammont aux animaux apprivoisés et tenus en captivité. En 1963, la loi n° 63-1143 indique d'une part que toute cruauté envers un animal domestique ou sauvage tenu en captivité et d'autre part que la réalisation d'expérience non conforme sur des animaux sont considérées comme un délit. En 1976, dans la loi relative à la protection de la nature n°76-629, l'animal est enfin perçu comme un être sensible qui doit être respecté : l'abandon est puni par la loi. Depuis, la législation vise non seulement à punir les actes humains portant atteinte à tout animal mais contribue également au bien-être de toutes les espèces animales quel que soit leur rôle et leur usage au sein de la société humaine.

Concernant les animaux utilisés en recherche, la transcription de la Directive Européenne 2010/63 en droit français abroge la Directive 86/609 : en découlent l'Ordonnance n°2012-10 en 2012 puis un an plus tard le Décret 2013-118 et cinq Arrêtés qui réglementent aujourd'hui l'expérimentation animale.

2. *Fonctionnement des Etablissements d'expérimentation animale (Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques ; Arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles)*

a) *Agrément des Etablissements (Articles 1 et 2)*

Les établissements d'expérimentation animale sont les éleveurs, les fournisseurs et les utilisateurs. Ils hébergent les animaux dans un but de reproduction ou dans le cadre de procédures expérimentales. Tous ces établissements doivent posséder un agrément pour accueillir des animaux.

La demande d'agrément s'effectue auprès de la Direction Départementale de la Protection des Populations (DDPP). Elle requiert :

- un plan du centre d'hébergement ;
- un tableau recensant le personnel et ses compétences ;
- une visite d'inspection des locaux.

L'agrément délivré par le Ministère de l'Agriculture est valide six ans. Tout changement de fonctionnement (ajout d'une espèce animale, construction de nouveaux locaux, etc...) doit conduire à une réévaluation de l'agrément.

b) *Normes d'hygiène, soins et hébergement des animaux (Annexe II)*

Les installations des établissements d'accueil doivent garantir une sécurité sanitaire et un confort de vie adaptés à chaque espèce animale présente.

Les installations empêchent l'intrusion d'animaux nuisibles ou de personnel non autorisé. Une séparation des animaux, des aliments et des produits d'entretien est obligatoire. Des salles de quarantaine peuvent être appréciables pour vérifier le statut sanitaire des nouveaux animaux. Un programme de nettoyage permet de conserver une hygiène stricte ; les matériaux des locaux et en contact avec les animaux doivent être facilement lessivables. Les personnels en contact avec les animaux portent une tenue dédiée à leur activité professionnelle. Enfin, un moyen de contrôle de l'état sanitaire de l'animalerie et des denrées alimentaires peut être instauré. Au minimum, un contrôle visuel quotidien est obligatoire pour vérifier l'état de santé des animaux.

Ces mêmes installations doivent répondre aux besoins comportementaux et physiologiques des animaux. Des paramètres sont à adapter à l'espèce animale détenue : la ventilation, la température, l'hygrométrie, l'éclairage et la gestion du bruit. Des dispositifs d'alarme peuvent indiquer une défaillance d'un de ces paramètres. L'hébergement en groupe est à favoriser. Les dimensions de l'habitat sont spécifiques et réglementées. La litière utilisée doit être adaptée. Un enrichissement du milieu de vie est obligatoire par le biais de jeu ou de cachette. Des zones d'activité physique ou de repos peuvent être aménagées.

L'accès à l'eau propre est constant. La nourriture doit être appétente, non contaminée et adaptée aux besoins métaboliques de l'espèce.

c) *Traçabilité (Articles 6 et 7)*

Un registre papier ou informatique doit permettre le suivi de toute entrée et sortie des animaux dans les établissements d'accueil. Toute correction du registre des entrées et sorties doit être mentionnée et justifiée. Les données requises (Annexe III) pour chaque espèce sont :

- « a) Le sexe, l'âge, le nombre d'animaux, le numéro individuel d'identification pour chaque animal des espèces bovine, ovine, caprine, porcine, équine, canine, féline ainsi que pour les primates ;
- b) La date de naissance (si elle a lieu dans l'établissement utilisateur) ;
- c) La date d'entrée, la provenance, en précisant notamment s'ils sont élevés en vue d'une utilisation dans des procédures et, dans le cas d'une importation, mention de cette importation avec ses références documentaires ;
- d) Pour les utilisateurs, les références des projets dans lesquels les animaux sont utilisés ;

- e) La date de sortie et la destination, le nom et l'adresse du destinataire des animaux ;
 f) La date et les causes de la mort (si elle a lieu dans l'établissement utilisateur). »

Pour les chiens, chats et primates, un dossier individuel doit nécessairement comporter l'identification de l'animal et son lieu et date de naissance. Ce dossier équivaut à un carnet de santé et de suivi de l'animal.

d) Contrôles et sanctions (Article 5)

La fréquence des visites des Etablissements dépend des espèces hébergées, du nombre d'animaux, des projets scientifiques réalisés sur site et des antécédents de conformité du bâtiment. Ainsi, au moins un tiers des Etablissements utilisateurs est contrôlé tous les ans. Les Etablissements hébergeant des primates et/ou des carnivores ou bien procédant à des études de classe sévère sont contrôlés annuellement. Les rapports d'inspection sont conservés 5 ans par le responsable de l'établissement inspecté.

L'article 521-1 du Code Pénal stipule que tout acte cruel ou sévère envers un animal de laboratoire, domestique ou sauvage est passible de 2 ans de prison et 30 000 euros d'amende.

3. Composition et formation du personnel (*Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques*)

L'article R214-114 du CR indique l'importance de la qualification des personnes travaillant dans les établissements d'expérimentation animale. L'Arrêté cité ci-dessus a pour but d'éclaircir les rôles des différents membres du personnel.

Quatre fonctions du personnel sont définies selon la formation initiale (ou niveau d'études) et la formation spécifique à l'expérimentation animale suivie : trois niveaux existent ainsi qu'un niveau chirurgie. Le programme de ces formations spécifiques est disponible dans l'Annexe du dit Arrêté (Article 4). A ces formations de base, s'ajoute une formation continue obligatoire de 3 jours en six ans (Article 5).

Tableau I : Récapitulatif des fonctions du personnel d'Etablissements d'expérimentation animale (Articles 2,3,4 et 5)

Qualification	Rôle	Niveau d'études et formation attendue
Concepteur	Conception ou réalisation des procédures expérimentales	*5 années d'études supérieures minimum dans une discipline scientifique OU Bac+2 et un minimum de 5 années d'expérience professionnelle sous la responsabilité directe d'une personne titulaire d'un diplôme mentionné ci-dessus. *Formation niveau I spécifique de l'expérimentation animale +/- Niveau chirurgie * Formation continue adaptée
Technicien	Application de procédures expérimentales aux animaux	*Formation par un tuteur *Formation niveau II spécifique de l'expérimentation animale +/- Niveau chirurgie * Formation continue adaptée
Animalier Soigneur	Soins aux animaux	*Formation par un tuteur *Formation niveau III spécifique de l'expérimentation animale *Formation continue adaptée
/	Mise à mort des animaux	*Formation par un tuteur *Formation niveau III spécifique de l'expérimentation animale minimum *Formation continue adaptée

Selon son parcours d'études et professionnel, chaque membre du personnel valide des compétences. Ces compétences sont répertoriées dans un livret individuel par le titre de la formation, le type de formation (colloque, pratique, théorique...) et les dates de son suivi puis de sa validation. Une personne de l'établissement est chargée de mettre à jour les compétences individuelles et d'adapter les futures formations de chaque membre du personnel (Article 1).

4. Autorisation des projets scientifiques utilisant des modèles animaux (*Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales, chapitre II*)

Tout projet scientifique doit faire l'objet d'une demande d'autorisation auprès du MESRI. Ce formulaire doit comprendre des informations générales, administratives, des justifications scientifiques du projet et les moyens prévus pour respecter le bien-être animal. Toutes les procédures expérimentales doivent être explicitées et classées selon un degré de gravité. Quatre classes existent selon la douleur et le stress engendrés chez l'animal : légère, modérée, sévère ou sans réveil.

Tableau II : Plan du formulaire de demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

1. Informations générales	Titre du projet Durée, date de début
2. Résumé non technique	Présentation du projet pour le grand public et justification des 3R
3. Informations administratives et réglementaires	3.1 Etablissement utilisateur (agrément, numéro d'enregistrement d'éthique du MESRI, responsable du bien-être, concepteur) 3.2 Personnel (nom et compétences) 3.3 Projet (objectif, description, méthode de mise à mort prévue, étude statistique préalable) 3.4 Animaux (espèces, nombre, sexe, origine, âge, nécessité, gestion douleur et points limites)
4. Procédures expérimentales	Objet visé par les procédures Description de chaque procédure (Classement selon degré de gravité, pertinence et justification, nombre de lots, nombre d'animaux, points limites, prélèvements avec fréquence et volumes, anesthésie, analgésie, hébergement des animaux, mise à mort, réutilisation, placement) Cas particuliers de procédures connues douloureuses ou angoissantes pour les animaux

Le dossier de demande d'Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques (APAFIS) s'enregistre en ligne sur le site du MESRI. Le comité d'éthique (détaillé au 5c) émet un avis sur le projet qui est communiqué au MESRI et au concepteur du projet (Bernardet, 2015). Une autorisation de projet est validée pour cinq ans maximum et délivrée par le MESRI ; le comité d'éthique ainsi que le responsable du projet en sont informés. Elle comprend les données de l'établissement utilisateur et du responsable de projet, l'avis favorable du comité d'éthique et la nécessité ou non du projet à être soumis à une étude rétrospective (Article 8).

Toute modification dans le projet initial pouvant avoir un effet négatif sur le bien-être animal doit engendrer une demande de modification de l'autorisation par le responsable de projet. Ce projet modifié est réévalué par le Comité d'éthique (Article 9). Une nouvelle demande d'autorisation est formulée si l'autorisation de projet arrive à échéance ou bien si le projet doit être modifié (Article 10).

5. Notion d'éthique et de bien-être animal

La notion de protection animale existe depuis la loi Grammont décrite auparavant. En 1945, la naissance de la Société Protectrice des Animaux (SPA) sous Napoléon indique une volonté de considérer l'animal comme un être vivant ayant droit à une certaine considération et une qualité de vie.

a) La prise en compte du bien-être animal : la règle des 3R

Le concept des 3R est initié par deux biologistes anglais Russel et Burch en 1959 dans l'article « *The Principles of Humane Experimental Technique* » et comprend les trois points suivants :

- Remplacer (*replace*) :

De nouvelles méthodes scientifiques doivent épargner l'usage d'animaux. Des études *in vitro* ou des modélisations informatiques sont disponibles. Par exemple, les tests de toxicité cutanée et oculaire sont aujourd'hui réalisables *in vitro* et validés au niveau international par l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) (CCPA, 2020).

- Réduire (*reduce*) :

Une étude statistique permet d'évaluer au plus juste le nombre d'animaux nécessaires. La réutilisation des animaux dans plusieurs études ou l'exploitation maximale de données sur un même animal permet également d'en diminuer le nombre.

- Raffiner (*refine*) :

Le but du raffinement est de diminuer les contraintes des animaux lors de manipulations qui s'avèrent stressantes. Pour les mammifères, un système de récompense peut être instauré pour rendre les actes médicaux moins désagréables. Des systèmes de télémétrie sont également développés afin de réduire les contacts avec les animaux tout en effectuant des relevés de plusieurs paramètres à la fois. La prise en compte et la gestion de la douleur par l'administration d'analgésiques ou une décision d'euthanasie est également importante. En parallèle, la qualité de vie des animaux de laboratoire passe par de bonnes conditions d'hébergement et un enrichissement de leur milieu.

Le concept des 3R a donc plusieurs facettes qui visent à renforcer le bien-être animal : les conditions d'hébergement et l'enrichissement, les méthodes de prise en charge de la douleur et les méthodes d'euthanasie. Elles sont spécifiques et réglementées dans l'Annexe IV de l'Arrêté du 13 février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles. Tout projet doit justifier les moyens employés pour respecter les 3R dans sa demande d'autorisation.

Un grand nombre d'associations françaises loi 1901 (à but non lucratif) existent dans les domaines du bien-être animal en recherche et du développement des méthodes alternatives. On peut citer :

- L'Association Française des Sciences et Techniques de l'Animal de Laboratoire (AFSTAL) créée en 1972 : elle participe à la formation du personnel affecté à l'expérimentation *in vivo* et relaie des informations en lien avec l'éthique en recherche animale ;
- Recherche Expérimentale et Protection de l'Animal de Laboratoire (OPAL) qui depuis 1968 travaille au développement des méthodes alternatives pour la recherche ;
- Le Groupe de Réflexion Interprofessionnel sur la Communication en Recherche (GIRCOR) regroupe des établissements de recherche biologique et médicale. Ce groupe est notamment le rédacteur du site recherche-animale.org qui permet au grand public un accès à la législation et à des sites scientifiques en lien avec la recherche animale.

Certaines associations sont orientées vers une technique comme le Groupe Francophone de Réflexion sur la télémétrie (GFRT) ou sont rattachées à une espèce ciblée telle que la Société Française de primatologie. Leur but est de réunir des professionnels qui travaillent avec un même procédé ou un même animal afin de développer les connaissances du terrain (AFSTAL, consultée le 20/03/20).

Des accréditations pour les établissements de recherche hébergeant des animaux sont possibles afin de faire valoir leurs efforts. On peut citer celle de l'Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC) qui est valable trois ans suite à la rédaction d'un 'Program Description' par l'établissement puis une visite de ce dernier (AAALAC, consulté le 20/03/20).

b) Structures chargées du bien-être animal (SBEA)

L'Article R214-103 du CR indique que tout établissement d'expérimentation animale doit se munir d'une SBEA.

L'Article 1 de l'Arrêté du 1^{er} février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques indique que dans tout établissement une (ou des) personnes surveille(nt) le bien-être des animaux et leurs soins. Cette tâche peut être attribuée à un vétérinaire, un concepteur de projets ou un technicien animalier définis précédemment.

L'Article 4 de l'Arrêté du 1^{er} février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles indique que la SBEA se compose de la ou des personnes citées ci-dessus et d'un concepteur de projet pour les établissements utilisateurs. Cette structure a un rôle de conseil, d'information et de mise à jour des protocoles internes pour garantir et améliorer le confort de vie des animaux auprès du personnel qui les manipule. Elle doit également vérifier l'avancement des projets, leur conformité de mise en œuvre et la nécessité de modification. La sociabilisation des animaux de laboratoire en vue de leur réinsertion auprès du grand public constitue la dernière mission de cette structure.

Toutes les décisions notifiées par la SBEA sont conservées pendant 5 ans.

c) Organisation et rôles des Comités d'Éthique en Expérimentation Animale (CEEA) (Arrêté du 1^{er} février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales, chapitre 1^{er})

Tout comité d'éthique est agréé auprès du MESRI et déclare les établissements utilisateurs qui en dépendent. En effet, un seul comité d'éthique est attribué à un établissement utilisateur. La liste des comités d'éthique et leur composition est publiée sur le site du MESRI ; tout changement doit donc être déclaré (Articles 1 et 2).

Chaque comité d'éthique se compose d'un panel pluridisciplinaire (Article 3) d'au moins 5 personnes afin de conserver une objectivité pour tout projet :

- « - une personne justifiant de compétences dans le domaine de la conception de procédures expérimentales sur les animaux ;
- une personne justifiant de compétences dans le domaine de la réalisation de procédures expérimentales sur les animaux ;
- une personne justifiant de compétences dans au moins l'un des domaines suivants : soins ou mise à mort des animaux ;
- un vétérinaire ;
- une personne non spécialisée dans les questions relatives à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques. »

(Article R214-113 du CR)

Les comités d'éthique respectent la 'Charte Nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale' rédigée en 2008 puis revue en 2014 ; elle reprend les principes, le fonctionnement d'un comité d'éthique et ses rôles.

Leur rôle principal est d'évaluer tous les projets scientifiques de leurs établissements pour l'obtention d'autorisation de projet. Cette évaluation comprend : la justification scientifique du projet et sa nécessité, la justification d'usage d'animaux et la prise en compte de leur bien-être par l'hébergement, la gestion de la douleur dans les procédures expérimentales et de mise à mort s'il y a lieu (Article 4). A l'issue de cette évaluation, le comité d'éthique émet un avis et parfois des recommandations. Un projet peut être refusé ou retardé s'il ne remplit pas correctement les missions indiquées.

Certains projets sont obligatoirement évalués rétrospectivement par le comité d'éthique ; l'article R214-120 du CR spécifie qu'ils incluent des primates ou bien des procédures de classe sévère. Cette analyse permet de comparer la description théorique avec l'application réelle du projet afin de constater les conditions d'usage des animaux pour proposer des solutions pour améliorer le respect des 3R (Article 7).

Chaque année, les comités d'éthique font un bilan de leur activité et liste les nouvelles méthodes utilisées en lien avec le bien-être animal.

Le Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale (CNREEA) émet des recommandations sur les dernières avancées en matière de bien-être animal et conseille les comités d'éthique.

Pour Conclure :

La réglementation de l'expérimentation animale est très large. L'émission de Directives Européennes tend à uniformiser la notion de bien-être animal au sein de l'UE afin de continuer la Recherche dans les meilleures conditions. Ces lois ont évolué rapidement ces dernières années et continuent à progresser : la législation n'est pas une notion immuable.

C. Usage des espèces concernées par l'expérimentation animale en France : exploitation des enquêtes statistiques d'utilisation des animaux à des fins scientifiques menées par le MESRI

1. La place de l'animal dans l'expérimentation

Les articles R214-90 à R214-98 du CR spécifient que les animaux de laboratoire sont élevés pour un usage strictement expérimental et qu'aucun animal sauvage ne peut être prélevé dans la nature en vue de cet usage sauf en cas de dérogation.

Depuis 2014, en adéquation avec la Directive Européenne 2010/609, le MESRI doit réaliser une enquête annuelle statistique sur les animaux utilisés à des fins de recherche en France. Les données sont collectées auprès de tout établissement utilisateur. Les comptes-rendus sont consultables sur le site du MESRI avec des rubriques précises : les espèces animales en jeu avec un focus concernant les primates non humains, leur provenance, leur statut génétique, la réutilisation des animaux, l'objet des projets scientifiques et leur classe de sévérité, la répartition des espèces utilisés dans des tests réglementés et l'échelle de ces réglementations.

Tableau III: Effectif total des animaux utilisés en recherche en France entre 2014 et 2017. (Source : Enquêtes d'utilisation des animaux à des fins scientifiques 2014-2017, MESRI)

Année	Effectif total des animaux utilisés en France
2014	1 769 618
2015	1 901 752
2016	1 918 481
2017	1 914 174

N.B. un animal réutilisé dans plusieurs projets est compté plusieurs fois.

En 2017, 92% de ces animaux sont nés en Union Européenne (UE), les autres étaient importés de structures internationales.

2. Les espèces utilisées en France

L'Arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions de fourniture de certaines espèces animales utilisées à des fins scientifiques aux établissements utilisateurs agréés indique les espèces animales utilisées dans des procédures expérimentales devant provenir d'élevages agréés :

- Souris (*Mus musculus*)
- Rat (*Rattus norvegicus*)
- Cobaye (*Cavia porcellus*)
- Hamster (doré) syrien (*Mesocricetus auratus*) ; Hamster chinois (*Cricetulus griseus*)
- Gerbille de Mongolie (*Meriones unguiculatus*) ;

- Lapin (*Oryctolagus cuniculus*) ;
- Chien (*Canis familiaris*)
- Chat (*Felis catus*)
- Primates, toutes espèces
- Xénope du Cap (*Xenopus laevis*), xénope tropical (*Xenopus tropicalis*), grenouille rousse (*Rana temporaria*), grenouille léopard (*Rana pipiens*)
- Poisson zèbre (*Danio rerio*).

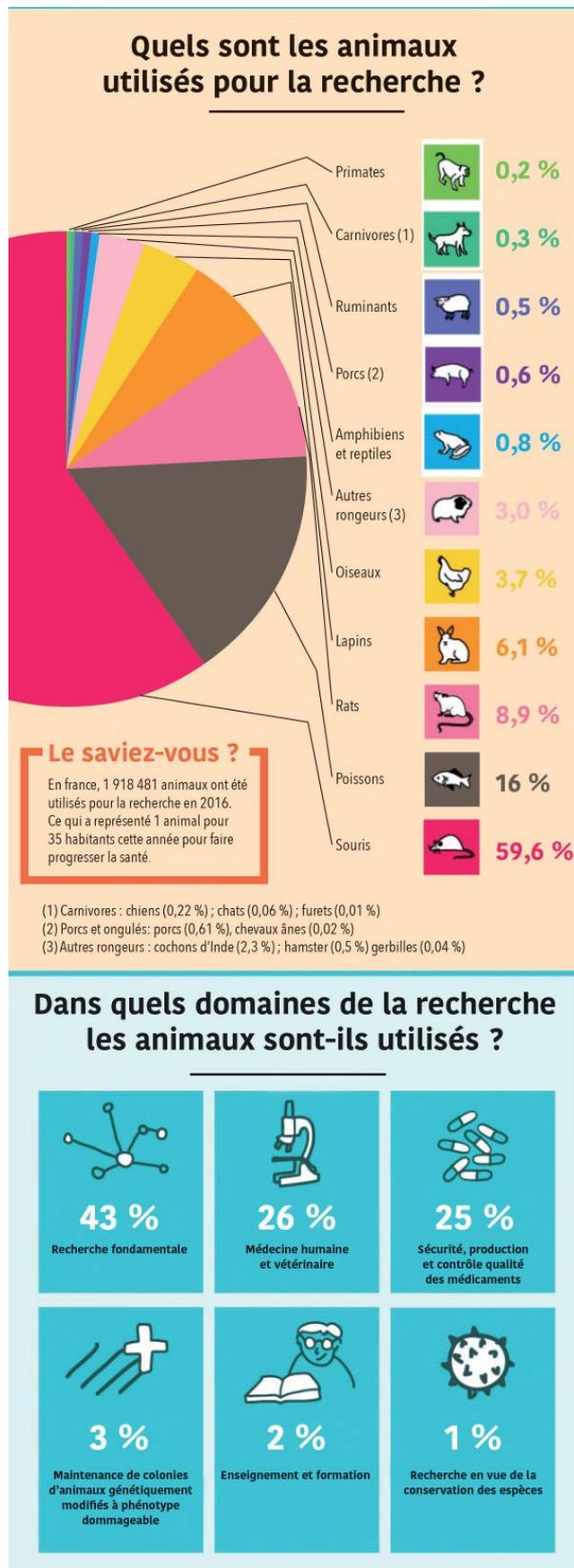


Figure 1 : Diagramme de répartition des différentes espèces animales utilisées en recherche en France et les domaines d'utilisation en 2016 (source : GIRCOR, 2016)

a) Rongeurs et Lagomorphes

Cette catégorie regroupe à elle seule 76% des animaux utilisés pour la recherche en France soit près de 1.3 millions d'individus en 2016. L'atout de ce groupe rongeurs/ lagomorphes est sa facilité d'élevage et de manipulation par sa petite taille et ses capacités rapides de reproduction. Selon une étude menée en UE comptabilisant 611 réponses, la grande majorité des rongeurs (rats et souris confondus) utilisés en recherche ont entre 6 et 20 semaines d'âge avec un pic de 6 à 12 semaines pour la souris (Jackson *et al.*, 2017).

La très faible réutilisation des rongeurs pour d'autres projets soit moins de 7 % des animaux en 2017, explique ce nombre élevé d'individus utilisés. Ce phénomène peut s'expliquer par leur durée de vie réduite, leur moindre coût à l'achat, leur implication dans de nombreux projets de classe sévère ou sans réveil, ou encore leur petite taille qui est incompatible avec la vie pour certains prélèvements de sang ou d'organes.

Les trois domaines majeurs des études pour ces espèces sont la recherche fondamentale, les recherches appliquées sur les pathologies animales ou végétales ou le bien-être animal et les études toxicologiques pour des médicaments ou des produits alimentaires. Leur usage pour l'enseignement ou les formations professionnelles est non négligeable.

La souris (*Mus musculus*) représente l'animal le plus utilisé en recherche avec quasiment 60% de l'effectif total des animaux en 2017. Ce chiffre est en hausse car elle représentait seulement la moitié de l'effectif total en 2014. Sa génétique est très proche de l'être humain avec 99% de gènes communs ainsi que la répartition des gènes sur les chromosomes (Sweeting, 2015).

Autre espèce phare appartenant à la même famille : le rat qui occupe la seconde place avec 8,9% de l'effectif total. Vis-à-vis de la souris, sa taille environ 10 fois plus grande permet de réaliser des chirurgies plus facilement. Ces deux espèces sont aussi valorisées dans la maintenance de colonies génétiquement altérées.

Le lapin est de grand gabarit mais de santé fragile et représente 6% de l'effectif total.

Le cochon d'Inde, le hamster et la gerbille sont majoritairement utilisés dans les études toxicologiques.

b) Poissons

En 2017, les poissons représentent 17% des animaux totaux dont seulement 1% de *Danio rerio* qui est la seule espèce de poissons devant provenir d'établissements agréés. Les 'autres poissons' proviennent d'élevages de truites, saumons ou bars...On constate une large diminution de leur utilisation car en 2014, il représentait 30% de l'effectif total. En plus de la recherche fondamentale et appliquée et les études toxicologiques, les poissons constituent quasiment l'unique groupe utilisé dans la recherche en vue de conservation des espèces ainsi que dans la protection de l'environnement. Ils sont impliqués dans des études classées légères à sévères. Les normes liées à la qualité de l'eau (pH, salinité, débit) sont primordiales pour leur élevage en animalerie.

c) Mammifères

On peut distinguer les carnivores et les animaux de rente.

Pour les carnivores, 4 106 chiens sont recensés en 2017, puis de manière plus anecdotique les chats avec 867 individus et 148 furets. Leur usage principal est la toxicologie avec des études de classe légère. 70% des chats permettent la validation de traitement vétérinaire et 75% des chiens la validation de produits à usage humain et vétérinaire confondus. Les autres chiens et chats apparaissent dans la recherche fondamentale et appliquée. Un tiers des chiens sont réutilisés seulement contre deux tiers pour les chats en 2017.

Concernant les animaux de rente, on peut citer par ordre décroissant les porcins avec 10 346 individus en 2017, les ovins, les bovins, les caprins et les équins. Ils sont surtout utilisés en recherche fondamentale. Toutes ces espèces sont incluses dans des études de classe légère avec une réutilisation des individus entre 45 et 65% excepté pour les porcins dont un tiers des individus sont impliqués dans des études sans réveil et seuls 10% d'entre eux sont réutilisés.

d) Cas particuliers des primates

En 2017, les primates non humains (PNH) sont au nombre de 3746 soit 0,19% de l'effectif total. Leur intérêt majeur est leur proximité génétique à 98% et neurologique avec l'Homme. Ils sont impliqués dans la recherche fondamentale et appliquée ainsi que la toxicologie. Par exemple, les singes permettent l'étude de la maladie d'Alzheimer ou du virus du sida en infectiologie (Animal Research.Info, 2018). Soixante pour cent d'entre eux sont réinclus dans de nouvelles études.

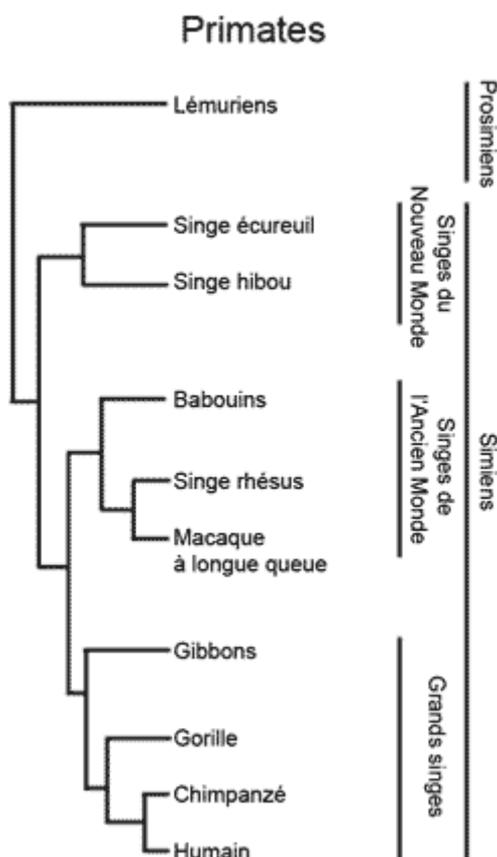


Figure 2 : Arbre phylogénétique des Primates (source : Green Facts, consulté le 10/04/20)

L'Article R214-94 du CR exclut l'usage des Grands Singes en expérimentation sauf cas dérogatoire depuis mars 2013 et décrit quelles procédures peuvent prétendre à l'usage de PNH.

Les macaques représentent 87% des PNH utilisés en 2017. Ces PNH sont tous nés en captivité et 35% font partis de la génération F2, le but étant de 100% en 2022. Les animaux de génération F0 ont été capturés dans la sphère sauvage ; la génération F2 est donc issue d'animaux eux-mêmes nés en captivité.

Les primates, par leur forte ressemblance génétique et comportementale avec l'Homme, posent problème du point de vue éthique. Des normes d'hébergement sont définies pour chaque espèce de primates dans l'Arrêté du 1^{er} février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles. Leur captivité est complexe car ils nécessitent un environnement permettant une activité physique et sollicitant leur intelligence. De plus, le sevrage varie entre l'âge de 6 et 12 mois.

e) Oiseaux

Cela concerne environ 70 500 individus dont 60% de poules domestiques (*Gallus gallus domesticus*) en 2017 et donc 3% de l'effectif total d'animaux. Pour la poule domestique, autant d'animaux sont utilisés en recherche fondamentale qu'en toxicologie tandis que pour toutes les autres espèces d'oiseaux, c'est la toxicologie qui prime. Les études sont de classe légère à modérée mais leur réutilisation est presque inexistante.

f) Autres espèces

Les amphibiens et les reptiles ne représentent même pas 1% de l'effectif total en 2017. Néanmoins, on note une nette augmentation de leur usage depuis 2014 avec un pic en 2016.

Leurs usages sont très différents : les grenouilles sont toutes utilisées pour l'enseignement supérieur dans des études sans réveil, surement des dissections. Les reptiles sont impliqués dans des études classées légères dans la recherche fondamentale ; de même pour les xénopes mais en recherche appliquée. Les xénopes sont utilisés dans la biologie cellulaire et du développement car la ponte de la femelle est proliférative et est déclenchable chimiquement (CRBX, consulté le 3/04/20).

Les reptiles sont très largement réutilisés à plus de 90% depuis 2015.

Un céphalopode, seul invertébré, présent au Palais de la Découverte est recensé depuis 2014 et associé à une mission de pédagogie.

Pour Conclure :

Les enquêtes statistiques réalisées par le MESRI depuis 2014 répondent aux exigences de la Directive 2010/63/UE. Cependant, le MESRI indique que l'évolution des chiffres doit être analysée avec prudence car :

- « les scientifiques ont eu besoin de s'approprier la nouvelle notion de procédure expérimentale avec les définitions d'un seuil et d'un degré de sévérité réelle (article R.214-89 du CR) ;
- un régime de mesures transitoires a été instauré en France pendant cinq années (article 5 du décret n°2013-118) instituant que les projets ayant bénéficié d'un avis éthique favorable sous l'ancienne directive 86/609/CEE, et dont la durée ne s'étendait pas au-delà du 1^{er} janvier 2018, soient considérés comme autorisés au sens du décret. Les procédures expérimentales n'étaient pas définies dans ces projets, rendant difficiles les dénombrements d'utilisations et la déclaration de leur degré de sévérité. » (MESRI, 2019)

Malgré ce possible décalage entre la réalité d'utilisation des animaux et les informations transmises par les établissements utilisateurs, les rongeurs restent majoritairement utilisés dans les procédures expérimentales en France.

D. Diminuer le nombre d'animaux voués à la recherche et améliorer leur cadre de vie : un enjeu sociétal

a) Usage raisonné des animaux de laboratoire : « reduce »

L'utilisation des animaux pour la recherche est nécessaire pour « protéger la santé humaine et animale ainsi que l'environnement » (Directive 2010/63/EU). Toutefois, l'effectif total des animaux doit être réduit. Selon l'analyse statistique du MESRI de 2017 sur l'utilisation des animaux à des fins scientifiques, seuls 30% des projets scientifiques utilisent des animaux pour respecter la réglementation européenne pour la validation d'un médicament humain ou vétérinaire, le contrôle de produit alimentaire ou la fabrication d'appareils médicaux. Cela concerne surtout le rat, la souris, le lapin et les poissons. Ainsi les animaux sont donc nécessaires et d'usage obligatoire pour la mise sur le marché de nombreux produits.

La réduction de leur nombre passe donc par leur réutilisation pour plusieurs projets quand cela est possible. Une anticipation par des tests statistiques du nombre d'animaux inclus dans un projet est obligatoire. Enfin l'usage de méthodes dites alternatives se développe.

b) La nécessité de développer des méthodes alternatives : « replace »

La Directive Européenne de 1986 encourage vivement le développement de méthodes alternatives afin de ne plus avoir recours aux animaux vivants, ce qui constitue le but final de son émission. Des groupes tel que FRANCOPA (Plate-forme nationale pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale) créée en 2007 exploite toute méthode pouvant réduire l'effectif total des animaux utilisés en expérimentation telles que les méthodes *in vitro*, l'approche 'omique', les 'organ-on-chip', les analyses informatiques, l'imagerie

cellulaire et la méthode *in silico* (ECOPA/FRANCOPA, 2018). En UE, l'European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) créée en 1991 valide officiellement toute méthode en adéquation avec les 3R et évitant un recours au modèle animal (European Centre for the Validation of Alternative Methods; consulté le 4/10/2020).

c) Confort de vie des animaux : « refine »

En expérimentation animale, il faut attendre la Directive Européenne de 1986 pour que le bien-être animal soit clairement réglementé. Tous les animaux doivent être traités selon leurs besoins physiologiques et avoir un confort de vie minimal adapté à l'espèce. La législation réglemente la dimension des logements et les conditions de l'environnement. Cependant, c'est le rôle des SBEA d'apporter des idées d'enrichissement adapté à l'espèce pour assurer un bien-être du point de vue comportemental et psychologique. Le simple respect des normes d'habitation ne sont pas suffisantes mais sont minimum. Par exemple, pour les chiens, des sorties et des moments de jeu doivent être prévus quotidiennement. Les minipigs peuvent avoir des ballons ou des chaines à mâchonner. Concernant les rongeurs, la présence de cachettes et d'objets à ronger sont intéressants (Gilbert, 2020).

d) Point de vue du grand public

Un grand nombre d'associations manifestent leur désaccord envers l'usage des animaux telles que One Voice, PETA ou Animal Cross. Selon elles, malgré la réglementation, beaucoup de projets fonctionnent sur les animaux mais échouent sur l'Homme car ces modèles ne sont pas fiables ni transposables. Le faible coût des rongeurs et leur statut de nuisible favoriserait leur grand usage.

Le grand public se plaint d'une méconnaissance de ce domaine « mystérieux » où les photographies, les renseignements concernant les lieux d'expérimentation animale ne sont pas disponibles. L'usage des animaux est flou et les conditions de vie inconnues. Pourtant, les textes réglementaires et les listes des comités d'éthique sont accessibles par tous ; le Centre National de la Recherche et de la Santé (CNRS) et le GIRCOR publient des articles et aménagent leur site internet pour le grand public. Le CNRS a également filmé une de ses animaleries hébergeant des macaques avec quelques explications (source : <http://visite-animalerie.cnrs.fr/>).

e) Option de seconde vie pour les animaux de laboratoire

La Directive 2010/63/EU signale que la mise à mort des animaux en fin de procédure n'est pas systématique et doit être justifiée. On a vu précédemment que certains animaux sont ainsi réutilisés dans plusieurs procédures expérimentales.

Pour certains animaux, une retraite par adoption est envisageable si l'étude dans laquelle ils sont impliqués est de classe légère ou modérée. Ces animaux doivent être en bonne santé (certificat vétérinaire de bonne santé obligatoire), ne pas présenter un risque pour l'environnement ni pour l'Homme et être sociable. La SBEA est chargée d'informer les établissements des conditions d'adoption et des méthodes de sociabilisation à réaliser.

Le Groupement de Réflexion et d'Action pour l'Animal (GRAAL) a permis 3 500 placements d'animaux issus de 80 Unités de recherche en France depuis 2005. Un Guide a été édité en 2017 en collaboration avec le Ministère de l'Agriculture afin de récapituler les informations et les démarches en lien avec la réhabilitation des animaux de laboratoire. L'association White Rabbit permet également le placement des lapins de laboratoire.

Le grand public a donc différents moyens de participer à l'adoption des animaux dans le domaine de la recherche que ce soit par l'accueil de ces animaux, sous forme de dons ou autre aide bénévole.

II. La souris de laboratoire

A. Généralités

1. Point de vue historique et usage moderne

Jusqu'au XX^e siècle, le rat et la souris sont souvent confondus. Par exemple, dans les langues chinoises et japonaises, le même mot désigne ces deux espèces. Au travers des époques, ces deux rongeurs sont souvent associés au Mal, à la misère et la maladie de par leur vie souterraine. Ils pillent les réserves des Humains et sont de mauvais augure. On trouve plusieurs légendes et contes à leur sujet. Plus positivement, les rongeurs deviennent une source d'inspiration pour les Arts : les arts plastiques, la littérature dans les Fables de La Fontaine ; le cinéma avec Mickey ; la musique avec la célèbre « souris verte ». En Chine, la souris est l'un des douze signes astrologiques (Wikipédia, 2020).

En recherche, la souris commence à être utilisée dès 1600. Au début du XX^e siècle, plusieurs chercheurs exploitent ses capacités de reproduction ; cela aboutit à la production de plusieurs souches vers 1950. Aujourd'hui cet animal est largement élevé pour l'expérimentation. Son utilisation est variée dans des essais de phase pré-clinique dans diverses branches de la médecine : cancérologie, immunologie, toxicologie, endocrinologie telles que le diabète, les maladies métaboliques et de l'appareil cardio-vasculaire. N'oublions pas que le modèle souris a valu quelques Prix Nobels , le premier revenant à Nicolle en 1928 pour la pathogénèse du typhus (Hardin-Pouzet *et al*, 2019).

2. Classification et génétique

La souris est un mammifère de l'Ordre des rongeurs et de la Famille des *Muridae*. Son nom latin est *Mus musculus* et il existe des sous-espèces notamment *domesticus* et *musculus* qui seraient à l'origine des souris de laboratoire (Jaubert).

Le génome de la souris est entièrement séquencé depuis 2002 : il possède environ 30 000 gènes répartis sur 2,5 milliards de bases. 99% de gènes seraient communs avec l'Homme (RTFlash, 2002). Le génotypage s'effectue par réaction en chaîne par Polymerase (PCR) à partir de prélèvements tels que des biopsies de queue ou d'oreille, des poils, de la salive, de selles ou du sang (Clinisciences, consulté le 12/04/20).

Aujourd'hui, des bases de données de génétique de la souris de laboratoire sont disponibles comme Mouse Genome Informatics (MGI) qui répertorie 59 114 gènes dont plus de 50 000 sont séquencés (MGI, consulté le 11/04/20).

La connaissance génétique de la souris permet également la création de lignées humanisées comme modèle d'études en remplaçant un gène de la souris par celui de l'Homme (Hardin-Pouzet *et al*, 2019).

3. Quelques données sur la souris à l'état sauvage (Danneman *et al*, 2013)

Nous ne développons ici que les caractères qui sont utiles à notre étude, qu'ils soient cliniques ou qu'ils apportent une explication sur l'usage de la souris en recherche et ses moyens d'hébergement.

Dans la nature, la souris a une espérance de vie de 1,5 à 3 ans et pèse entre 20 et 40 grammes. Le poids varie selon la souche (Janvier Labs). La souris est un animal nocturne, de caractère sociable et vit en groupe. A noter tout de même que les mâles entiers peuvent se révéler agressifs : l'expression du mâle dominant dans un groupe peut s'exprimer par de simples bagarres repérables par des morsures ou des pertes de poils voire par la mort d'un congénère dans les cas les plus graves. Certaines souches sont plus agressives que d'autres notamment les Balb/c (Suckow *et al*, 2013). Les femelles sont plus dociles entre elles sauf lorsqu'elles sont gestantes ou en lactation. La souris est une proie dans la nature et doit pouvoir s'isoler et se cacher.

Les différents sens de la souris ont leur importance dans la vie sociale. Elle entend et émet des ultrasons avec ses congénères ; les sécrétions urinaires et certaines glandes permettent le marquage et la communication ; les vibrisses permettent l'orientation, la détection de vibrations et la communication avec les congénères. Enfin sa vision est dichromatique : elle possède les pigments bleus et verts mais pas le rouge, qu'elle distingue donc comme du noir. Les souris albinos sont très sensibles aux fortes luminosités (AFAR, consulté le 11/04/20).

Cette espèce nidifuge a des grandes capacités de reproduction grâce à une maturité sexuelle vers 40-60 jours, une durée de gestation courte 19-21 jours et une taille de portée entre 4 et 12 souriceaux. La différenciation sexuelle est visible par le scrotum chez le mâle et la présence de 5 paires de mamelles chez la femelle (2 thoraciques et 3 abdominales). Chez le jeune, la longueur du périnée permet de distinguer les deux sexes.

Le régime alimentaire de la souris est de base herbivore (plantes, racines, graines, fruits) voire insectivore

ce qui la rend omnivore. La prise alimentaire est divisée en plusieurs repas dans la journée et équivaut à un apport énergétique d'environ 10 kcal par jour. La souris est également coprophage, ce qui permet une meilleure absorption des nutriments lors du second passage des selles dans le tube digestif. La souris n'est pas capable de vomir : la mise à jeun avant une anesthésie n'est donc pas nécessaire. Ses quatre incisives sont à croissance continue ce qui classe la souris comme rongeur.

La prise hydrique est constante : la souris peut être très vite déshydratée du fait de sa petite taille. Les pertes en eau sont limitées par l'absence de glandes sudoripares et l'émission d'urines concentrées de densité de l'ordre de 1,040 (Peggy, 2013). On estime à 5-8 mL le besoin journalier en eau de boisson par souris (Sirois, 2015).

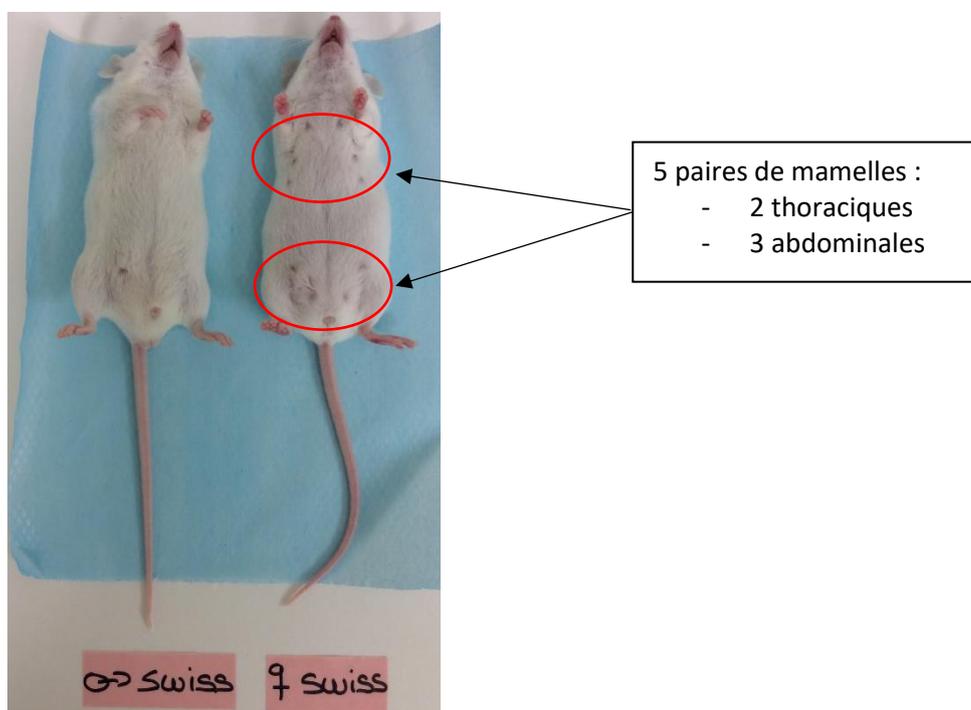


Figure 3 : Photographie de 2 souris SWISS de 13 semaines, le mâle à gauche et la femelle à droite.

Quelques données chiffrées :

- Fréquence cardiaque : 325-780 battements par minute (bts/min)
- Fréquence respiratoire : 60-220 mouvements par minute (mvts/min)
- Température rectale : 36,5-38 °C. La souris ne comporte pas de glandes sudoripares. Sa queue est un moyen de régulation de sa température corporelle.

4. *Adaptation de la vie en laboratoire de la souris (Annexes de l'Arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles)*

Les normes réglementaires de logement des animaux d'expérimentation animale ont été établies pour respecter le bien-être des animaux et le concept des 5 principes du Farm Animal Welfare Committee (FAWC) stipulant :

- L'absence de faim et de soif
- L'absence d'inconfort physique
- L'absence de douleur, de plaies ou de maladies
- L'expression d'un comportement normal spécifique
- L'absence de peur et de stress

a) Hébergement

En animalerie, un rythme jour/nuit est imposé par un éclairage cadencé et réglé. L'intensité lumineuse doit

prendre en compte le caractère albinos des souches présentes. La température ambiante doit être dans une fourchette de 20 à 24°C. L'hygrométrie n'a pas de normes particulières pour les rongeurs mais est recommandée entre 45 et 65%. Le système de ventilation doit permettre un renouvellement d'air. Les sons des alarmes doivent être adaptés pour ne pas gêner leur bien-être et une isolation phonique peut être nécessaire.

Basiquement, les souris sont logées en groupe dans une cage en plastique avec une grille comportant une mangeoire et un biberon. Les surfaces et la hauteur des cages sont réglementées selon le poids de la souris (voir tableau IV). En animalerie, les deux sexes sont hébergés séparément sauf en cas de reproduction ; la stérilisation n'est pas un acte courant sur les rongeurs de laboratoire. Dans ces espaces de vie, un espace de repos et des matériaux permettant la construction d'un nid doivent être prévus dans les zones de reproduction. L'enrichissement dans les cages peut comporter des cachettes en plastique rouge qu'elle ne perçoit pas, des frisottis en carton généralement utilisés pour fabriquer une zone de confort ou un morceau de bois pour limer leurs dents.

Tableau IV : Réglementation des dimensions des cages hébergeant des souris (source : Annexe II de l'Arrêté du 1^{er} Février 2013)

	POIDS CORPOREL (g)	DIMENSION MINIMALE du compartiment (cm ²)	SURFACE AU SOL par animal (cm ²)	HAUTEUR MINIMALE du compartiment (cm)	DATE d'application
Réserve et pendant les procédures	Jusqu'à 20	330	60	12	1er janvier 2017
	De plus de 20 à 25	330	70	12	
	De plus de 25 à 30	330	80	12	
	Plus de 30	330	100	12	
Reproduction		330 Pour un couple monogame (non consanguin/consanguin) ou un trio (consanguin). Pour chaque femelle supplémentaire avec sa portée, il faut ajouter 180 cm ²		12	
Réserve chez les éleveurs (*) Taille du compartiment : 950 cm ²	Moins de 20	950	40	12	
Taille du compartiment : 1 500 cm ²	Moins de 20	1 500	30	12	

(*) Les souris sevrées peuvent être hébergées avec ces densités de peuplement plus élevées pendant la courte période qui suit le sevrage jusqu'à ce qu'elles se reproduisent, à condition d'utiliser des compartiments plus grands et d'assurer un enrichissement suffisant et que ces conditions d'hébergement ne réduisent en rien le bien-être des animaux, étant par exemple à l'origine d'une plus grande agressivité, morbidité ou mortalité, de stéréotypies et d'autres troubles du comportement, perte de poids ou autres réactions physiologiques ou comportementales au stress.

b) Alimentation et prise de boisson

En animalerie, la nourriture est distribuée sous forme de granulés à volonté. Ce conditionnement est simple à manipuler et permet une usure des incisives *a minima*. L'eau présentée dans un biberon en captivité doit être disponible à volonté et être propre.

c) Enrichissement et bientraitance animale (Gilbert, 2020)

La bientraitance animale regroupe les moyens mis en œuvre pour permettre le bien-être animal et l'expression de comportements normaux variés. Ont déjà été vus les caractères de base réglementés et obligatoires au bon logement des souris mais ils ne sont pas suffisants. La SBEA doit toujours veiller à ce que les animaux soient confortables physiquement et psychologiquement. Une souris qui s'ennuie ou mal adapté à son milieu de vie en laboratoire peut présenter des stéréotypies tels que des sautilllements, des tournis, des sauts périlleux ou un hyper-

toiletage. Pour mettre en place un enrichissement dans l'habitat des souris, il est impératif de savoir comment cette espèce répartit son budget temps, c'est-à-dire quelles activités sont faites et leur fréquence.

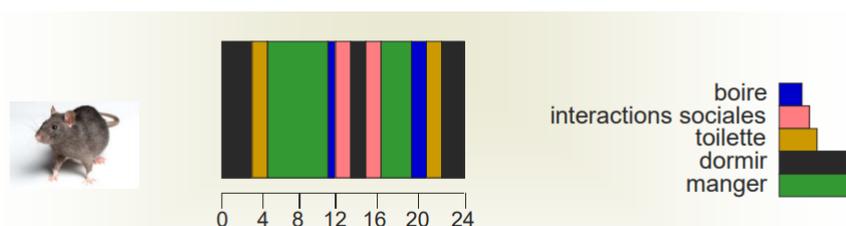


Figure 4: Répartition du budget temps de la souris de laboratoire (source: Gilbert, 2020)

Passer du temps avec les animaux en dehors des manipulations expérimentales est positif. L'usage de tubes, cachettes, matériaux pour faire un nid et à ronger sont intéressants pour le bien-être des souris. La variation des couleurs et des textures peut permettre de varier encore plus cet enrichissement. Enfin, l'observation fréquente des animaux permet de vérifier la qualité et la nécessité de cet enrichissement. L'existence de grilles détaillant les grimaces faciales des animaux peut aider à reconnaître un animal douloureux ou mal adapté à son milieu (Langford et al., 2010)

d) Hygiène et contrôles sanitaires (Inserm, 2009)

Les souris sont sensibles à beaucoup d'agents pathogènes. Tous les établissements d'hébergement doivent veiller à une gestion sanitaire permanente.

Les locaux doivent être construits avec des matériaux simples d'entretien et avec des sas empêchant l'intrusion de nuisibles ou de germes. L'air de la ventilation est constamment renouvelé et filtré afin de conserver le statut de l'animalerie. La manipulation des rongeurs sous des Postes de Sécurité Microbiologique (PSM) permet de filtrer l'air et d'éviter la propagation de poussière et d'allergènes, issus d'animaux ou d'objets inertes, vers les manipulateurs. Le matériel en contact avec les animaux (cages, grilles, biberons, litière) doit être changé régulièrement selon le nombre d'animaux. Les produits de lavage et désinfectants et leur fréquence d'application sont adaptés. Parfois l'autoclavage (stérilisation par chaleur humide) peut être nécessaire. Le principe de marche en avant permet d'éviter une contamination du matériel propre.

Le personnel doit se changer avant d'entrer dans l'animalerie et porter des vêtements de travail : blouse, gants, manchettes, masque et charlotte pour palier l'introduction de germes.

L'hébergement des rongeurs a une influence directe sur la contamination ou la diffusion d'allergènes. Il est adapté au statut sanitaire et notamment au statut de l'immunité des souris ou à la présence contrôlée de germes pathogènes. Les cages sont ouvertes ou disposent d'un couvercle filtrant. Ces cages sont disposées sur :

- portoirs simples qui sont économiques mais statiques ;
- portoirs ventilés. Ils ventilent individuellement des cages à couvercle filtrant, chacune étant raccordée au circuit général délivrant de l'air filtrée (filtre à air à haute efficacité ou HEPA). La ventilation de chaque cage est optimisée et permet la diminution de fréquence du change qui doit s'effectuer sous hotte pour ne pas perturber ce micro-environnement. Ce système réduit également les allergies pour le personnel ;
- dans une armoire ventilée. Elle abrite un nombre restreint de cages mais permet de les isoler et de les ventiler collectivement. Son dispositif d'alarme doit être actif pour pallier à un dysfonctionnement qui peut s'avérer léthal ;
- dans un isolateur. L'air entrant et sortant du dispositif est filtrée (filtre HEPA), le manipulateur ne touche pas l'animal directement mais par le biais de manchettes avec des gants interchangeables. Ce système onéreux et encombrant est réservé aux animaux immunodéficients.

La nourriture est souvent irradiée et l'eau filtrée pour détruire tout germe potentiellement pathogène.

Les animaux à statut sanitaire inconnu doivent être placés en quarantaine avant introduction. Cependant, la majorité des rongeurs proviennent d'établissements agréés : la quarantaine est remplacée par une période d'acclimatation. Cette période d'acclimatation à l'arrivée des animaux en animalerie est bénéfique. Des études ont cherché à en définir la durée optimale. Le transport et la découverte d'un nouvel environnement sont source de

stress influant sur de nombreux paramètres chez le rat tels que le poids, la fréquence cardiaque ou l'activité physique (Capdevila *et al.*, 2007).

Le contrôle sanitaire est justifié pour le risque zoonotique, l'influence d'une infection/ infestation sur la vie des rongeurs et sur les résultats des procédures expérimentales et lors de transfert entre les établissements. La Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) représentée par L'AFSTAL, communique quels agents rechercher avec le prélèvement adapté ainsi que sa fréquence (Mähler *et al.*, 2014). Des souris sentinelles sont couramment utilisées : elles sont mises en contact avec la nourriture et la litière de toutes les souris de la même salle lors du change des cages. Des prélèvements (sang, urines, poils, fèces, salive) permettent de diagnostiquer une infection par sérologie, culture bactérienne ou PCR voire par autopsie.

e) Gestion de la fin de vie

L'euthanasie des souris est réglementée en fin de projet (pour rappel, la souris est peu réutilisée dans plusieurs projets) ou en cas de souffrance sévère lors d'une procédure expérimentale.

Tableau V : Méthodes d'euthanasie valables chez la souris de laboratoire (source : extrait de l'annexe IV de l'Arrêté du 1^{er} Février 2013)

Méthode de mise à mort	Conditions particulières
Surdosage anesthésique	Utilisé, le cas échéant, avec une sédation préalable de l'animal
Dioxyde de carbone	Augmentation progressive du gaz. Ne pas utiliser sur les fœtus ni les nouveaux-nés
Dislocation cervicale	/
Commotion/ percussion de la boîte crânienne	/
Décapitation	Utiliser en cas d'impossibilité d'autres méthodes

B. Les différentes souches utilisées dans l'étude

Nous nous limiterons à détailler les points suivants vis-à-vis des trois souches de souris utilisées dans l'étude.

1. Etablissements éleveurs ou fournisseurs de rongeurs

L'AFSTAL recense des entreprises professionnelles en lien avec l'expérimentation animale. Les organismes Charles River, Envigo et Janvier Labs sont spécialisées pour la fourniture de souris de laboratoire (AFSTAL,2016). Sur les sites internet de vente de ces établissements, les différents modèles de souris sont détaillés au niveau de leur génétique, leurs qualités maternelles et comportementales, les domaines d'utilisation. Janvier Labs met également une courbe pondérale pour chaque souche. Des programmes (Genetic Stability Program ou Janvier Labs Gentic Policy) permettent par ailleurs de garantir une stabilité génétique des lignées consanguines aux utilisateurs.

2. Vocabulaire et nomenclature (Institut Pasteur, consultée le 10/04/2020)

Une lignée est l'ensemble de la descendance d'un couple de souris donné. Elle est qualifiée de « lignée pure » si le couple initial est homozygote.

Une souche dérive de géniteurs d'une lignée consanguine dont les accouplements sont libres sans apport d'une autre lignée. Elle est « close » lorsqu'elle comprend au moins quinze couples au départ.

Chaque lignée ou souche de souris est nommée selon des règles de nomenclature. Cette nomenclature est universelle et spécifique, elle permet de caractériser la provenance d'une colonie de souris et quelques caractéristiques génétiques.

En général, une abréviation composée de 3 à 4 lettres, dont la première est en majuscule, indique le scientifique ou le laboratoire qui a créé la lignée ou la détient. Le Laboratory Registration Code répertorie ces abréviations. Par exemple, 'J' fait référence au Jackson Laboratory et 'Rj' fait référence au laboratoire Robert Janvier. Pour tout scientifique, ce peut être l'initiale de son nom. Il est donc commun de retrouver diverses combinaisons de lettres dans un nom de souche car des échanges ont eu lieu pour faire progresser la recherche sur des colonies de souris. Par exemple, on trouve la souche C57Bl/6JRj qui a d'abord été élevée chez Jackson Laboratory puis chez Janvier Labs.

Un '/' indique le passage d'une lignée à une souche, l'élevage s'est poursuivi sur un nombre restreint d'individus.

Un chiffre ou un nombre indique la génération. Par exemple, le '6' de la C57Bl/6J indique la sixième génération de la souche issue de la lignée C57Bl.

Pour les souches plus complexes où des gènes sont modifiés, le nom du gène est indiqué en italique avec une majuscule et l'allèle en exposant. Par exemple, le gène codant pour le récepteur de la leptine et l'allèle des animaux diabétiques s'écrit : *Lepr^{db}*. Si une majuscule est présente pour l'allèle alors il est dominant.

3. Lignées consanguines

a) Définition (Institut Pasteur, consultée le 10/04/2020)

Une lignée consanguine ('inbred strain') est une colonie de souris d'accouplements entre frères et sœurs ou bien entre parents et enfants sur un minimum de 20 générations consécutives. Ce type de lignée est homogène génétiquement au cours du temps. Toute variance phénotypique est facilement repérable et étudiable avec un faible nombre d'individus.

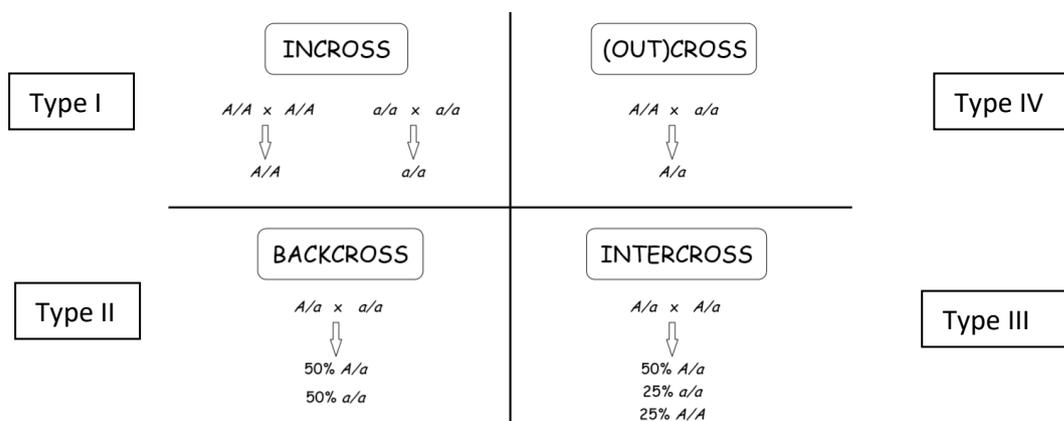


Figure 5 : Schéma des 4 types de croisement génétiques possibles pour un gène avec deux allèles A et a (source : Institut Pasteur)

Grâce à ce schéma mimant des accouplements, on s'aperçoit que suivant le croisement réalisé à la génération N, on ne peut prétendre qu'à certains croisements pour la génération N+1 suivant le génotype obtenu.

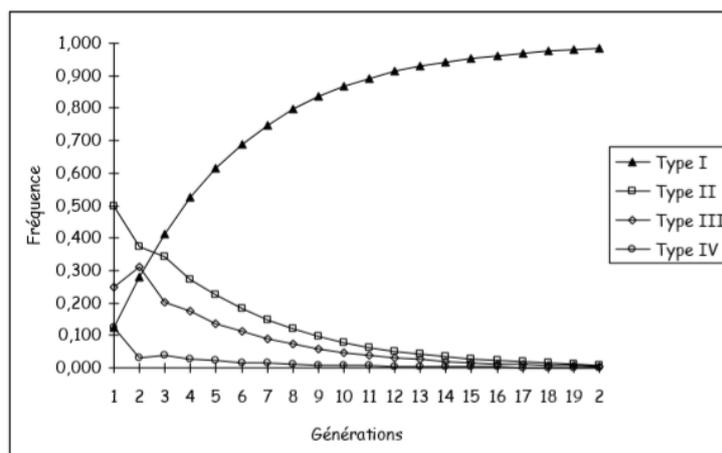


Figure 6 : Graphique donnant la fréquence d'apparition de chaque croisement précédemment défini dans la figure 4 au cours des générations (source : Institut Pasteur)

Ces deux graphiques indiquent bien qu'au fur et à mesure des générations, la possibilité de croisement s'appauvrit pour valoriser les croisements de souris homozygotes et donc favoriser des individus homogènes génétiquement.

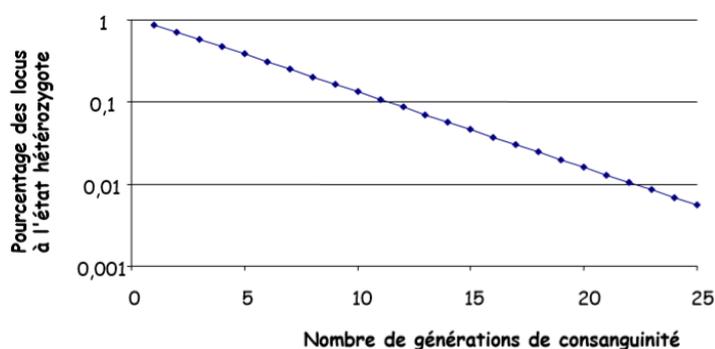


Figure 7 : Evolution du pourcentage du génome à l'état hétérozygote au cours des générations d'une lignée consanguine (source : Institut Pasteur)

Toutefois les lignées consanguines sont plus fragiles en élevage et très sensibles à des mutations génétiques ou des variations de l'environnement. Enfin, toute observation faite sur quelques individus ne sera pas généralisable à l'échelle de la population.

b) [C57Bl/6J \(Janvier Labs ; The Jackson Laboratory, consultés le 11/04/20\)](#)

Cette souche est également appelée la B6J ou la black 6 et très communément employée. Son génome est le premier à être séquencé dans les années 2000. Cette souche est un petit gabarit facile à manipuler, son caractère peut se révéler agressif. Son espérance de vie est de 2 ans ; elle présente une perte d'audition tardive.

Elle provient d'un croisement des souris de LATHROP puis est développée par C.C. LITTLE dans les années 1920 à partir de 52 mâles et 57 femelles. Puis en 1937, la colonie du Jackson Laboratory a donné deux sous-lignées C57Bl/6 et C57Bl/10.

Cette souche est caractérisée par une incidence de 1 à 4% pour l'hydrocéphalie, une faible densité osseuse, une forte incidence de malocclusion et de microphthalmie et une addiction à la morphine. La C57Bl/6J est peu sensible aux tumeurs primaires. Elle présente souvent au cours de sa vie une alopecie caractéristique d'origine comportementale.

Elle est utilisée pour créer des modèles transgéniques (introduction d'un gène dans une lignée consanguine) car elle exprime un grand nombre de mutations. Elle est également utilisée dans l'étude des maladies

neurodégénératives, l'oncologie et l'immunologie. Des pathologies comme l'obésité, le diabète ou l'athérosclérose (Paigen et al., 1985) peuvent être induites par une alimentation spécifique.

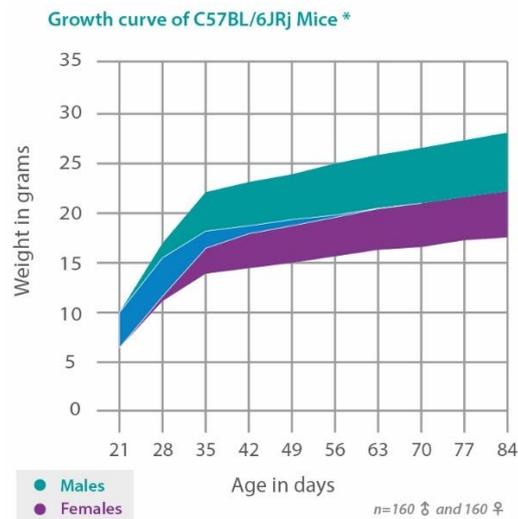


Figure 8 : Courbe pondérale de la Black 6 (source : Janvier Labs)

c) Balb/c

La souche a été sélectionnée par DOWELL en 1922 à partir de souris albinos non consanguines. Le Docteur SNELL en récupère la 26^{ème} génération. Le '/c' fait allusion au génotype du pelage de cette souris albinos.

Cette souche est sensible au niveau oculaire pouvant présenter des blépharites et des abcès péri-oculaires. Elle est sensible à l'hydrocéphalie et à la malocclusion (Janvier Labs, consulté le 11/04/20).

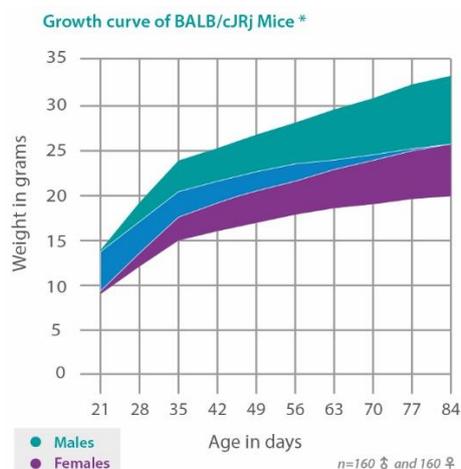


Figure 9 : Graphique de la croissance pondérale d'une souris de souche Balb/c (source : Janvier Labs)

Cette souche est connue pour permettre la synthèse d'anticorps monoclonaux grâce à l'induction d'un plasmocytome suite à l'injection d'huile minérale. Elle est sujette à des processus tumoraux primaires pulmonaires et rénaux et des tumeurs réticulaires. En revanche, les tumeurs mammaires sont de faible incidence (The Jackson Laboratory, consulté le 11/04/20).

Cette souche est également utilisée dans des études d'inflammation pulmonaire d'origine allergique car sa réponse immunitaire est orientée dans la synthèse des lymphocytes T helper de type 2 (Th2) et dans la production des interleukines 4, 5 et 13 produites en particulier par ces lymphocytes (Gueders *et al.*, 2009).

4. Lignée non consanguine : la SWISS

Une lignée non consanguine (outbred strain en anglais) est l'opposée des lignées consanguines car elle se

doit d'être plus proche de la population naturelle avec une génétique hétérogène entre les générations. Le coefficient de consanguinité doit être inférieur à 1% entre deux générations (Chia *et al.*, 2005). Pour cela, les géniteurs sont mélangés sans cesse. La population est définie par la fréquence des allèles.

Ces souches sont donc plus robustes. L'étude du génotype d'une population est plus compliquée car il faut un grand nombre d'individus pour se rapprocher de la réalité et étudier une différence (Jaubert, no date).

Un grand nombre de colonies non consanguines dérive d'une colonie SWISS de 200 individus élevés à Lausanne en Suisse par André De Coulon dans les années 1920. Deux mâles et sept femelles ont été importés à New York au Rockefeller Institute et ont permis la création de nouvelles souches (Chia *et al.*, 2005).

La souris SWISS est albinos et possède de bonnes qualités maternelles. Son caractère est docile. Elle est homozygote pour le gène *Tyrc* codant pour la tyrosinase, enzyme impliquée dans la synthèse de la mélanine. Elle est de statut SOPF (Specific and Opportunistic Pathogen Free) c'est -à-dire qu'elle est immunodéficiente et sensible à tout germe pathogène ou opportuniste car non soumise à cette flore. Elle est donc intéressante comme sentinelle pour le suivi sanitaire d'une animalerie (Janvier Labs, consulté le 11/04/20).

Cette souche est de grand gabarit, les sujets mâles peuvent avoisiner les 50 grammes à 12 semaines.

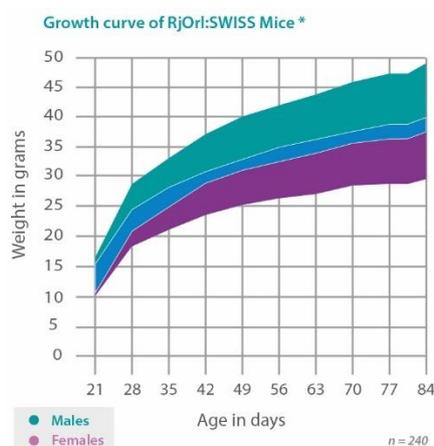


Figure 10 : Graphique de la courbe de poids de la souche SWISS (source : Janvier Labs)

III. Anesthésie des souris de laboratoire

L'anesthésie des animaux permet aujourd'hui d'éviter le concept de vivisection longtemps utilisé.

A. Les différentes voies d'administration : avantages et inconvénients

Différentes voies existent pour administrer un anesthésique à une souris. La voie d'abord est choisie selon l'acte effectué ainsi que la disponibilité des équipements. Pour les molécules injectables : les moyens de contention disponibles, la durée de l'intervention, le volume maximal injectable en un même point, les propriétés des molécules anesthésiques sont des éléments permettant de choisir une voie d'abord plutôt qu'une autre.

1. L'anesthésie gazeuse

a) Usage et avantages

L'anesthésie gazeuse peut être utilisée afin de séduer légèrement les animaux pour un acte bénin où la contention sur une souris vigile est compliquée comme la pose d'une boucle d'identification à l'oreille. Cette technique permet également des prélèvements sanguins de grand volume par ponction cardiaque avant une euthanasie. Enfin, elle est pratique pour de longues chirurgies.

L'avantage de l'anesthésie gazeuse est due à la conformation des poumons, organe cible d'administration des molécules anesthésiques : la grande surface d'échange et la riche vascularisation pulmonaire favorisent la prise des gaz (Puyt, 2016).

b) Matériel spécifique

Ce type d'anesthésie utilise des gaz anesthésiques diffusés via un poste à anesthésie spécialement développé pour l'anesthésie des rongeurs. Cet appareil nécessite une source d'air comprimé ou bien d'oxygène ; un liquide anesthésique est vaporisé puis y est mélangé. Le poste anesthésique doit être adapté au gaz, c'est le point d'ébullition de la molécule qui définit son état liquide ou gazeux. Plus le point d'ébullition est bas, plus c'est facile de vaporiser le liquide anesthésique. Les concentrations des gaz frais et de l'anesthésique sont adaptées selon l'espèce et le moment de l'anesthésie. Par exemple, l'induction nécessitera un pourcentage de gaz anesthésique supérieur à celui nécessaire à l'entretien de l'anesthésie (Flecknell, 2016).



Figure 11 : Photographie d'un poste à anesthésie TEC3 de chez TEM SEGA® pour rongeurs (source : J. Drochon, responsable technique de l'Unité Technique Expérimentale, Nantes)

Pour des actes nécessitant seulement une sédation, une boîte à induction est intéressante pour diminuer les manipulations de la souris. Le matériel est lavé entre chaque animal afin de conserver une bonne hygiène (Flecknell, 2016).



Figure 12 : Boîtes à induction anesthésique pour petits animaux (source : VetTech UK, consulté le 25/03/20)

Si une anesthésie gazeuse de plus longue durée est souhaitée, deux opportunités sont possibles (Flecknell, 2016) :

- Les gaz anesthésiques peuvent être administrés par le biais d'un masque facial de taille adaptée afin de ne pas perdre une quantité trop grande de ces gaz ou de devoir en insuffler une dose plus importante. Son utilisation est très facile. L'inconvénient du masque est de ne pas pouvoir monitorer la fonction respiratoire en cas de forte dépression respiratoire ou d'un arrêt. Il peut également gêner une chirurgie faciale ou cervicale.



Figure 13 : Exemple de masque pour souris (Danneman et al, 2013)

- L'intubation endotrachéale offre une imperméabilité des voies respiratoires durant une anesthésie : les gaz anesthésiques arrivent directement aux poumons. Aucune sonde n'est adaptée à la souris qui devrait avoir un diamètre de 1 mm (Flecknell, 2016) : pour ce faire, un cathéter de 20 gauge (G) (Thomas *et al.*, 2014) ou 26G (Miranda *et al.*, 2017) la remplace. L'animal doit être en décubitus dorsal, incliné tête vers le haut. Cette méthode est également utilisée chez le rat (Flecknell, 2016). Certaines firmes comme Kent Scientific Corporation proposent la table d'intubation avec un masque intégré et le nécessaire d'intubation à partir de 675 dollars (environ 600 euros).



Figure 14 : Kit d'intubation des rats et souris (source : Kent Scientific, consulté le 25/03/20)

Cependant ce geste technique est compliqué à réaliser. C'est pourquoi différentes techniques permettent de visualiser la trachée ou du moins l'épiglotte pour s'assurer que le cathéter ne soit pas dans l'œsophage : usage d'un otoscope et d'un guide de Seldinger (Flecknell, 2016), usage d'un otoscope et d'un speculum de 2 mm de diamètre, la vidéoscopie (Miranda *et al.*, 2017) ou la réalisation d'une incision cutanée au niveau du cou pour visualiser le passage du cathéter. Certains ont même créé un dispositif de rallonge branché sur le cathéter contenant une goutte d'eau : son mouvement se calant sur le rythme respiratoire si la sonde est bien dans la trachée (Watanabe *et al.*, 2009).

L'intubation endotrachéale est la seule possibilité pour placer la souris sous ventilation assistée même si cet acte est peu réalisé en routine chez les rongeurs (Flecknell, 2016). En pathologies pulmonaires, des appareils tels que le FlexiVent® sont placés sur des souris trachéotomisées et relèvent divers paramètres caractérisant la fonction respiratoire et le tissu pulmonaire (McGovern *et al.*, 2013).

Quel que soit le mode d'administration des gaz, l'anesthésie volatile permet de moduler la profondeur anesthésique en adaptant le pourcentage de gaz administrés. L'induction et le réveil sont rapides dès l'administration ou l'arrêt des gaz anesthésiques, respectivement. En revanche, l'anesthésie gazeuse demande un certain équipement onéreux à l'achat et dans son entretien ainsi qu'une formation pour son usage.

2. Les voies parentérales

a) La voie intra-péritonéale (IP)

Cette voie est particulièrement adaptée aux rongeurs qui sont très mobiles car la contention de l'animal et l'injection sont réalisées par la même personne. Le geste doit être précis afin d'éviter la lésion d'organes internes et prévenir d'éventuelles péritonites ou hémorragies.

Une étude (voir figure 15) a mis en évidence un taux d'erreurs d'injection de l'ordre de 14% avec des sites préférentiels d'injection qui sont les intestins, le caecum, l'estomac, la vessie, l'espace rétropéritonéal, sous-cutané ou intra-vasculaire (Steward *et al.*, 1968). Une autre étude a permis de localiser plus précisément le caecum sur 100 souris Balb/c par dissection (voir figure 14) : il se place au niveau du quadrant caudal gauche de l'abdomen pour au moins 80 % des souris indépendamment de leur sexe. L'absence de ligament propre au colon et la localisation du colon transverse peuvent expliquer la variabilité anatomique du colon rencontrée chez la souris avec toutefois une préférence de localisation dans le quadrant gauche (Uysal *et al.*, 2017).

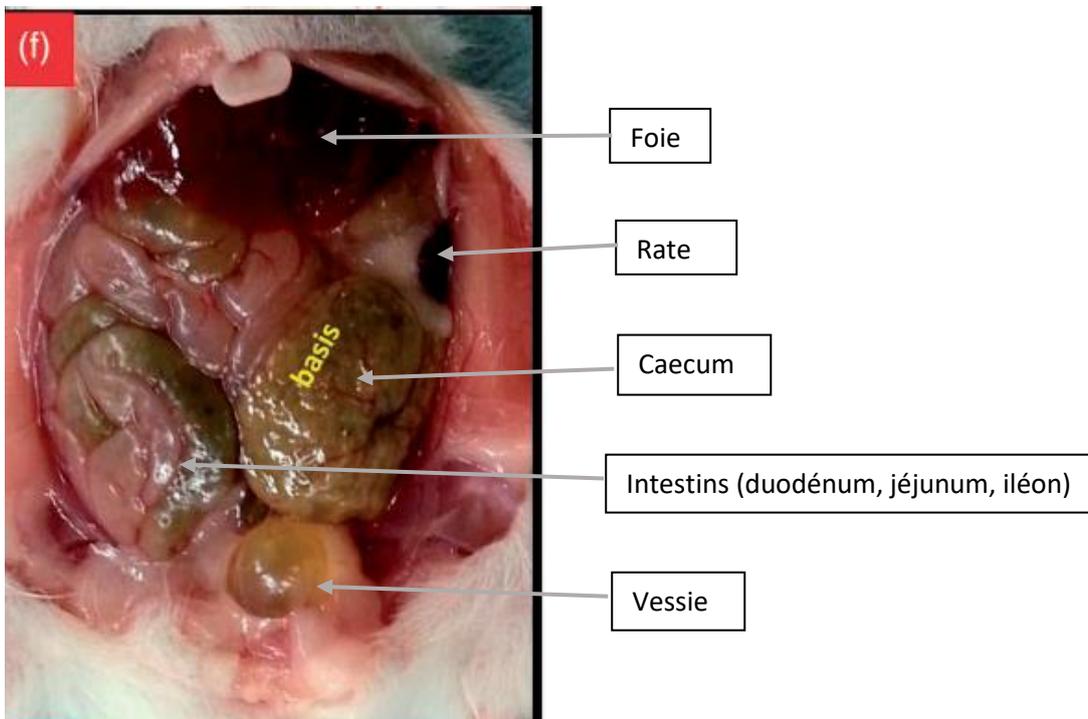


Figure 15 : Photographie des organes abdominaux de la souris (Uysal et al., 2017)

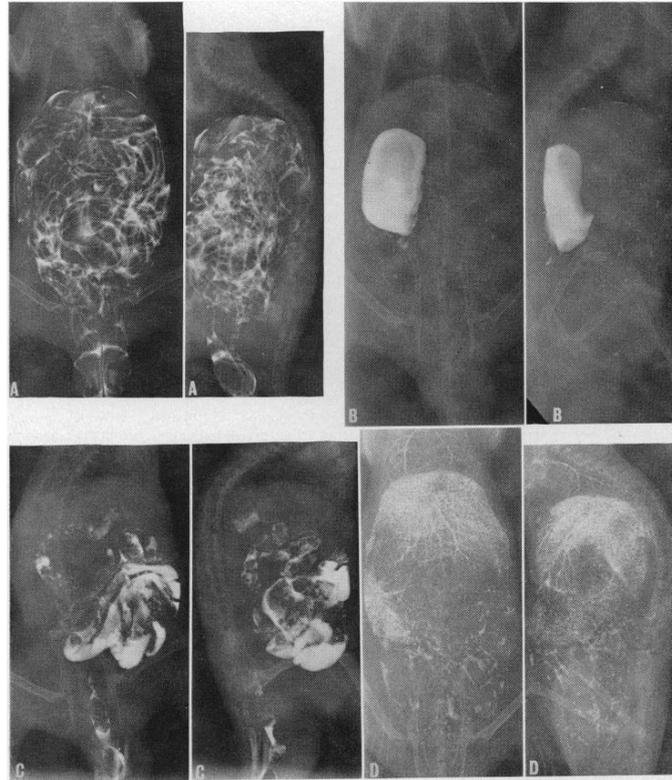


FIG. 1. Location by X-ray of Ethiodol, supposedly injected intraperitoneally in mice. (A) Intra-peritoneal injection showing that distribution includes peritesticular space. Reticular pattern is due to negative bowel shadows. (B) Retro-peritoneal injection. Negative kidney shadow can be faintly seen. (C) Injection into the small bowel. (D) Intravascular injection. Most of the Ethiodol has localized in the liver and spleen.

Figure 16 : Localisation radiographique après injection IP chez des souris d'un produit de contraste (ethiodiol) Localisation abdominale et dans l'espace péri-testiculaire (A), rétropéritonéale (B), intestinale (C), intravasculaire (D) (Steward et al., 1968)

Il est donc conseillé de réaliser une injection IP dans le cadran abdominal droit. Certains préconisent un angle de 45 degrés afin de traverser facilement les couches cutanées et musculaires (Bogdanske et al, 2010). Autres avantages de la voie IP, l'absorption de l'anesthésique est rapide par la densité du réseau capillaire du péritoine et de grands volumes peuvent être injectés (Das et al, 2007). Notons tout de même que les molécules peuvent subir une première métabolisation hépatique (Svendson, 2005) lors de leur passage du péritoine viscéral dans les capillaires veineux, alimentant la veine porte (Puyt, 2016).



Figure 17 : Photographie montrant la zone conseillée d'injection pour la voie intrapéritonéale soit le cadran abdominal droit (Flecknell, 2016)

b) La voie intraveineuse (IV)

La voie IV est très utilisée chez les carnivores car les molécules sont déposées dans la circulation générale et donc leur action est quasi instantanée (Puyt, 2016).

Chez la souris, la petite taille des veines et le dynamisme de l'animal rendent difficile leur usage (Flecknell, 2016). Il est intéressant de placer les animaux sous lampe chauffante 10 minutes avant de faire les injections ou bien d'appliquer un matériau tiède ; la chaleur va dilater les vaisseaux sanguins et permettre de mieux visualiser les veines sous la peau. Sans sédation, il est possible d'injecter des anesthésiques via les veines latérales de la queue qui sont bien visibles à sa base grâce à un éclairage adapté (Danneman *et al*, 2013). Mais le geste technique est assez minutieux et demande une certaine habitude de manipulation. Ce moyen est intéressant dans le cas d'une injection ponctuelle.

Si des injections anesthésiques sont répétées en association avec d'autres injections médicamenteuses, il est judicieux de poser un cathéter veineux. Son emplacement dépend de la durée de l'étude, le nombre d'injections totales et de la facilité d'accès dont on a besoin. Au niveau de la queue, le « tail cuff » peut être utilisé mais nuit au bien-être de la souris qui utilise celle-ci pour s'équilibrer.

Pour des projets de moins d'une semaine, le cathéter est implanté au niveau des veines jugulaires avec un système d'accès interscapulaire voire plus crânial sur la tête. Pour des projets de plusieurs semaines, le cathéter est posé dans la veine cave par la veine fémorale située en face médiale des membres postérieurs. La pose de harnais peut laisser un accès plus long au cathéter (Delphine Bouard, consulté le 19/03/2020).



Figure 18 : Exemples de dispositifs de cathétérisation avec accès bouton à gauche, harnais de maintien d'un cathéter sur un mannequin de souris au centre (source : PHYMEP, consulté le 10/04/20) et port d'un tail cuff à droite (source : Charles River, consulté le 20/03/20)

c) La voie intra-musculaire (IM)

Cette voie est facile d'accès, l'injection est réalisée principalement au niveau de la cuisse. Cependant, il faut pouvoir bien bloquer la souris car une douleur est possible au point d'injection. Une nécrose post-injection peut aussi survenir. Un grand volume injecté ou bien la présence d'un adjuvant irritant engendrent une douleur pour la voie IM (Flecknell, 2016). Des tunnels en plexiglass existent afin d'avoir accès aux postérieurs uniquement et empêcher le mouvement en avant de la souris. Les risques de lésions nerveuses existent, il est conseillé d'injecter en face externe pour ne pas léser le nerf sciatique. Il faut veiller à ne pas injecter dans un vaisseau sanguin en testant le piston de la seringue.

d) La voie sous cutanée (SC)

La voie SC est plutôt facile d'accès car entre les deux omoplates. La souris doit être correctement maintenue pendant l'injection. L'acte d'injection est rapide mais le temps d'action de l'anesthésique varie individuellement (Flecknell, 2016).

e) Conclusion sur les voies parentérales

Les voies parentérales demandent peu de matériel : aiguille (gauge 25 ou pour insuline) et seringue de 1 ml. La complexité est d'associer les anesthésiques pour obtenir l'anesthésie adaptée aux actes réalisés. Ces voies génèrent tout de même une induction et un réveil plus long que l'anesthésie volatile.

La voie IV est la seule voie permettant d'ajuster une anesthésie en cours contrairement aux voies IP, IM et SC dont l'efficacité varie selon la souche de la souris. Cependant la voie IV n'est pas la plus accessible chez la souris et les volumes administrables sont très réduits (voir tableau VI).

Les voies IM et SC peuvent se révéler douloureuses (Flecknell, 2016). L'absorption des molécules par ces deux voies est ralentie par une première phase de dissolution : les molécules doivent se dissoudre respectivement dans le tissu conjonctif musculaire ou sous-cutané (Puyt, 2016).

La voie IP semble avantageuse car elle permet l'administration d'un grand volume soit 0,4 ml pour une souris de 20 gr et est simple dans sa réalisation. De plus, le passage des molécules s'effectue par diffusion simple et paracellulaire uniquement. Cependant, il faut garder à l'esprit qu'un taux d'erreur est présent selon la zone d'injection.

Tableau VI : Récapitulatif des volumes administrables selon la voie d'injection pour une souris (Diehl et al., 2001)

Voie d'injection	Volume recommandé (ml/kg)	Volume maximal (ml/kg)
IV	5 (bolus)	25
IP	20	80
IM	0,05 ml / site	0,01 ml/ site
SC	10	40

B. Les différentes molécules utilisables en anesthésie et leur impact sur l'organisme

Une anesthésie générale est un phénomène réversible de perte de conscience induite chimiquement. Lors d'une anesthésie générale, quatre composantes doivent être respectées :

- la narcose : l'animal doit présenter une perte de conscience et une perte des réflexes
- l'analgésie : le principe d'analgésie multimodale doit être appliquée pour anticiper et gérer toute manifestation douloureuse au cours d'une procédure chirurgicale, quelle que soit sa nature
- la myorelaxation : le relâchement musculaire facilite l'abord chirurgical
- la sécurité des molécules utilisées selon le stade physiologique et pathologique de l'animal et le type d'opération pour lequel il est anesthésié (Desfontis *et al.*, 2017).

Une anesthésie générale se réalise normalement en quatre phases : la pré-médication, l'induction, l'entretien et le réveil. Cependant, chez les rongeurs, la première étape visant la tranquillisation, la détente de l'animal et une analgésie pré-opératoire est peu réalisée (Fish *et al.*, 2009).

Toutes les molécules présentées peuvent être utilisées seules ou en association pour initier une anesthésie ; elles ne sont pas toutes disponibles avec une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) vétérinaire. On rappelle que l'AMM est obligatoire pour tout médicament mis sur le marché par une entreprise pharmaceutique suivant des règles de fabrication. Un dossier constitué de quatre parties doit être soumis à l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV) qui délivre l'AMM : la partie administrative contenant le résumé des caractéristiques du produit (RCP), la qualité, la sécurité d'utilisation sur les animaux, l'utilisateur et l'environnement et enfin l'efficacité du produit (Anses, consulté le 1/04/2020). L'AMM est demandée pour une ou plusieurs espèces. Pour les rongeurs, il existe peu de médicaments vétérinaires avec AMM rongeurs ou animaux de laboratoire.

L'aspect pharmacologique sera brièvement évoqué pour se concentrer sur l'action visible sur le plan clinique qui nous intéresse dans le cadre de notre étude. Seules les molécules utilisées chez la souris sont présentées.

1. Les anticholinergiques

Également appelés parasympatholytiques, ce sont des antagonistes de l'acétylcholine pour les récepteurs muscariniques.

a) L'atropine

Cette molécule réduit les sécrétions salivaires et bronchiques qui pourraient obstruer les voies aériennes. Elle prévient également la fonction cardiaque de l'inhibition du nerf vague pouvant se produire lors de l'intubation trachéale ou lors de chirurgies du tube digestif (Flecknell, 2016). En tant que parasympatholytique, l'atropine induit

une tachycardie, une baisse du péristaltisme digestif et une mydriase (Desfontis *et al*, 2017). Cet agent est surtout employé en urgence lors de bradycardies consécutives à l'emploi contingent d'autres molécules. Son action est de courte durée due à un rapide métabolisme. Flecknell indique une posologie de 0,04 mg/kg chez la souris par voie SC.

b) Le glycopyrrolate

Son action est similaire à l'atropine mais de durée plus longue. Une étude menée sur des rats a montré qu'une administration intramusculaire (notée IM) d'atropine à 0,05 mg/kg avait des effets tachycardisants pendant 30 minutes tandis que le glycopyrrolate à 0,5 mg/kg par voie IM agissait pendant 4 heures. Le glycopyrrolate est donc préféré à l'atropine (Olson *et al.*, 1994).

2. Les tranquillisants majeurs ou neuroleptiques

Les neuroleptiques induisent une sédation, ils potentialisent les effets anesthésiques d'autres agents et réduisent donc les doses d'anesthésiques nécessaires (Flecknell, 2016). Ces molécules sont liposolubles par leur conformation et sont donc affines pour les cellules du système nerveux central dans le cortex, le système limbique et l'hypothalamus (Desfontis *et al*, 2017).

a) Les phénothiazines

Ces molécules sont des antagonistes des récepteurs dopaminergiques D₁ et D₂ majoritairement. On peut citer le chef de file des phénothiazines qui est la seule molécule disponible en médicament vétérinaire : l'acépromazine (ACP). Les effets recherchés sont la tranquillisation de l'animal et la potentialisation des autres agents anesthésiques. Cependant, un effet anti-émétique, une ataxie et une hypothermie sont présents. Les phénothiazines sont aussi anti alpha1-adrénergiques et induisent donc une hypotension et une vasodilatation (Desfontis *et al*, 2017). Elles sont à proscrire pour les états de choc. Leur action est de 6 à 8 heures ce qui est intéressant pour un réveil calme post chirurgie (Flecknell, 2016).

b) Les butyrophénones

Leurs effets sont comparables aux phénothiazines avec néanmoins une plus grande affinité pour les récepteurs antidopaminergiques (Desfontis *et al*, 2017). Le dropéridol peut être utilisé chez la souris à 10-20 mg/kg en association avec un opioïde et un alpha2 agoniste par voie IP (Leal *et al.*, 2006) .

3. Les sédatifs analgésiques ou alpha2 agonistes

Les alpha2 agonistes regroupent la xylazine (X), la médétomidine (M) et la dexmédétomidine et ont des propriétés sédative, myorelaxante et légèrement analgésique. Leur action est concentrée sur les récepteurs alpha2 adrénergiques. En revanche, la xylazine moins spécifique agit également sur les récepteurs alpha1 adrénergiques (Desfontis *et al*, 2017). Ils induisent une bradycardie, une hypertension puis une hypotension réflexe, une dépression respiratoire, une hyperglycémie, augmentent la diurèse et sont émétisants. Il ne faut pas les utiliser sur un animal diabétique, en état de choc, une femelle gravide ou un état d'obstruction urinaire (AEENVN, 2017).

Leur gros avantage est de pouvoir réverser leur action à l'aide de sympatholytiques tels que l'atipamézole (A). Certains auteurs indiquent que l'atipamézole peut être injecté par les voies sous-cutanée, intra-musculaire, intra-péritonéale ou intra-veineuse (Flecknell, 2016) tandis que le RCP de l'ATIPAM NDV présente une AMM chien/ chat avec une administration par voie IM seulement. La dose de l'atipamézole est à adapter selon la dose d'alpha2 agoniste administré. L'injection doit se faire entre 15 et 60 minutes après celle de la médétomidine (Flecknell, 2016). Des effets secondaires rares à l'atipamézole sont mentionnés dans le même RCP tels que « hyperactivité, tachycardie, salivation, vocalisations anormales, tremblements musculaires, vomissements, augmentation du rythme respiratoire, émission d'urine et défécation incontrôlées ». Flecknell conseille

d'attendre 30 à 40 minutes si de la kétamine a également été administrée. En effet, la présence d'anesthésique dissociatif peut engendrer une hypertonie musculaire. Les effets cardio-vasculaires dus à l'action sympatholytique peuvent être amplifiés si l'alpha2 agoniste est déjà éliminé (Desfontis *et al*, 2017).

4. Les tranquillisants mineurs ou benzodiazépines

Les benzodiazépines comme le diazépam ou le midazolam agissent en tant qu'agonistes des récepteurs GABA, permettent une bonne myorelaxation et une sédation légère. Leur action est de courte durée, elles présentent peu d'effets secondaires. Par ailleurs, le diazépam a des propriétés anti-convulsivante et orexigène (Desfontis, 2017).

5. Les molécules d'induction

a) Les agents dissociatifs

La kétamine (K) et la tilétamine sont deux agents dissociatifs antagonistes des récepteurs NMDA et permettent une narcose profonde. La kétamine offre également une bonne analgésie cutanée, sa demi-vie est de 20 à 30 minutes. En revanche, elle augmente le tonus musculaire ce qui est à l'encontre de la myorelaxation recherchée en anesthésie. Les effets indésirables sont nombreux : hypertension artérielle et intracrânienne, hypersécrétion salivaire, épileptogène, conservation du réflexe laryngé, léger effet dépresseur respiratoire et hallucinogène (AEENVN, 2017). Leur administration est possible par voie IM, IP et IV (Flecknell, 216). La tilétamine est toujours utilisée en combinaison avec le zolazépam, une benzodiazépine, qui sont associés dans la spécialité ZOLETIL NDV.

b) Le propofol (P)

Cet agoniste des récepteurs GABA permet d'obtenir une narcose et une myorelaxation. En impliquant une vasodilatation périphérique, le propofol induit une hypotension voire une bradycardie ainsi qu'une dépression respiratoire. Son action dure 10 à 15 minutes d'où la possibilité de l'utiliser en perfusion continue (Constant Rate Infusion ou CRI). Sa métabolisation est multiple : rénale, pulmonaire et hépatique (AEENVN, 2017). Sa faible solubilité dans l'eau implique sa commercialisation sous forme d'émulsion injectable. Il est donc déconseillé de l'utiliser sur un animal présentant une hyperlipidémie La voie d'administration reste l'IV stricte selon le RCP du PROPOVET NDV.

c) L'alfaxalone

L'alfaxalone (ou alphaxalone) agit sur les mêmes récepteurs que le propofol, son temps d'action est légèrement supérieur. En revanche, il est disponible en solution et administrable par les voies IV, IM et SC. Il est métabolisé par la voie hépatique uniquement.

d) L'étomidate et le métomidate

Ils offrent une bonne perte de conscience mais aucune analgésie s'ils sont injectés seuls. Ils ont peu d'effets cardio-vasculaires et respiratoires mais impliquent des spasmes musculaires (AEENVN, 2017). Le métomidate seul à 50 mg/kg en IP ou l'étomidate à 30 mg/kg permet d'anesthésier la souris 10-15 min sans chirurgie (Green *et al.*, 1981).

6. Les barbituriques

Parmi les barbituriques, peuvent être cités le phénobarbital, le pentobarbital (Gallos *et al.*, 2004) ou le thiopental. Leur voie d'administration commune est l'IV ; l'IP est également plausible pour le thiopental (Flecknell, 2016). Leur injection est douloureuse et il peut être intéressant de les administrer avec un

anesthésique local (Reimer *et al*, 2019). Ils induisent une dépression respiratoire majeure et n'ont aucune valence analgésique (Desfontis *et al*, 2017). Leur sécurité d'emploi est très faible car leurs doses anesthésiques sont très proches des doses létales (Flecknell, 2016). Les spécialités anesthésiques à base de barbiturique ne sont plus commercialisées et ces molécules ne sont utilisées aujourd'hui que comme euthanasiant (Desfontis *et al*, 2017).

Pour Conclure :

Utilisées seules, toutes ces molécules permettent une immobilisation plus ou moins longue sans assurer une analgésie suffisante pour un acte chirurgical.

Tableau VII : Récapitulatif des posologies, voies d'administration et effets des molécules sédatives chez la souris (modifié de Flecknell, 2016)

Molécule	Posologie (mg/kg)	Voie d'injection	Effet
Atropine	0,04	SC	anticholinergique
Acépromazine	2-5	SC ou IP	Légère sédation
Dexmédétomidine	0,015-0,05	SC	Légère à profonde sédation
Médétomidine	0,03-0,1	SC	Légère à moyenne sédation
Xylazine	5-10	IP	Légère sédation, analgésie modérée
Kétamine	100-200	IM	Sédation profonde, analgésie faible
Propofol	26	IV	Anesthésie chirurgicale (5-10 min)
Alfaxalone	10	IV	Anesthésie chirurgicale (5 min)
Thiopental	30-40	IV	Anesthésie chirurgicale (5-10 min)
Diazépam/ Midazolam	5	IM ou IP	Légère sédation

7. Les agents anesthésiques gazeux : les gaz halogénés

Les deux gaz les plus utilisés actuellement en médecine vétérinaire sont l'isoflurane et le sévoflurane. Ils sont non inflammables. Ils peuvent être utilisés comme inducteurs directement sur les petits animaux ou en relais après des inducteurs injectables (Flecknell, 2016). Il faut donc disposer de masque ou bien réaliser une intubation endotrachéale qui permet d'avoir une ligne de vie respiratoire en plus de la voie veineuse via un cathéter. Leur administration par voie pulmonaire est possible par leurs propriétés :

- Volatile : elle est grande et facilite son mélange à l'air dans les appareils anesthésiques
- Stable dans leur forme de commercialisation
- Liposoluble pour passer la membrane alvéolo-capillaire dans les poumons et atteindre les cellules du système nerveux central puis des autres organes riches en lipides. De ce fait, les animaux obèses accumuleront les anesthésiques volatils sur une plus longue durée.
- Soluble : c'est le rapport entre la concentration de gaz dissous dans le sang et sa pression partielle dans l'air insufflé. Les gaz halogénés sont peu solubles dans le sang ce qui implique d'attendre environ 15 minutes avant d'atteindre la concentration alvéolaire maximale mais permettent l'obtention d'un réveil rapide après arrêt des gaz.

Ils induisent une légère hypotension et une dépression respiratoire. Ils sont sans effet analgésique notable (Desfontis *et al*, 2017). Ces deux gaz sont non inflammables et non irritants.

Ils sont caractérisés par la Concentration Alvéolaire Minimale (notée MAC) qui permet de connaître pour une espèce donnée, la concentration minimale d'un anesthésique volatil pour laquelle 50% des animaux ne répondent à aucun stimulus. Une MAC est donc propre à un gaz donné pour une espèce définie. Une variation existerait également entre les souches de rongeurs (Mogil *et al.*, 2005).

Tableau VIII : Comparaison des deux gaz halogénés isoflurane et sévoflurane (Flecknell, 2016 ; SBEA, 2018)

Gaz anesthésique	Isoflurane	Sévoflurane
MAC souris (%)	1,41	2,5
Coût	++	+++
Odeur	+	-
Rapidité induction et réveil	+	++
Inhalation induction (%)	3-5	4-5
Inhalation entretien (%)	1-2,5	2-3,5

8. Les analgésiques

En raison du principe d'analgésie multimodale, il est intéressant d'associer divers groupes de molécules afin d'en réduire les posologies et de potentialiser leurs effets. Pour définir leur posologie et les associations ; la douleur est évaluée selon des paliers d'intensité définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) :

- Palier 1 : douleur légère -> analgésique périphérique (dit non opioïde) : anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)
- Palier 2 : douleur modérée -> analgésique central (dit morphinique faible) +/- analgésique du palier 1
- Palier 3 : douleur intense -> morphiniques forts +/- analgésiques des paliers 1 et 2 (*Les médicaments de la douleur : les paliers de l'OMS - Fédération Hospitalière de France (FHF)*, consulté le 2/04/20)

Nous ne détaillerons pas les moyens utilisés pour évaluer la douleur chez la souris car notre étude porte uniquement sur une anesthésie non chirurgicale.

a) Les anesthésiques locaux

Ces agents ont deux fonctions : anesthésier localement et permettre l'analgésie d'une zone définie de quelques centimètres ou un membre entier, sans perte de conscience de l'animal. On peut les injecter au niveau de la moelle épinière par une péridurale pour anesthésier l'arrière train (Fairbanks, 2003).

Deux molécules avec AMM vétérinaire sont utilisées : la lidocaïne et la bupivacaïne. Elles agissent sur les canaux ioniques, sodiques principalement, et par plein d'autres mécanismes (Beloil *et al.*, 2009). Elles diffèrent surtout par leur temps d'action qui est de 10-15 minutes et 3-4 heures respectivement (Fish *et al.*, 2009). La bupivacaïne ne doit pas être injectée par voie veineuse (AEENVN, 2017). La ropivacaïne utilisée en humaine est également utilisable chez les rongeurs (Fish *et al.*, 2009).

Sur les rongeurs, il a été montré qu'une perfusion à débit constant (constant rate infusion ou CRI) sous-cutanée, délivrée par une mini-pompe, de lidocaïne à 2,5 mg/kg/h ou de bupivacaïne à 0,5 mg/kg/h avait un effet anti-inflammatoire et réduisait le risque de péritonite septique suite à une chirurgie abdominale (Gallos *et al.*, 2004). A hautes doses, les anesthésiques locaux présentent une toxicité pour les cellules nerveuses ; l'ajout de dexaméthasone pourrait contrer cet effet toxique (Ma *et al.*, 2010).

b) Les opioïdes

Ces analgésiques sont classés en fonction des récepteurs sur lesquels ils agissent : *mu*, *kappa* et *delta*.

(A) LES AGONISTES ENTIERS

Leur forte valence analgésique est appréciée en post-opératoire dans une gestion adaptée de la douleur ; en pré-médication leurs valences analgésique et sédative sont exploitées. D'autres actions sont répertoriées : émétisante, déprimeur respiratoire, myotique, hypotenseur, ralentissement du transit digestif.

Morphine :

Cette molécule est l'opioïde de référence pour son analgésie. Cependant chez la souris, son action ne dure qu'entre 2 et 4 heures ce qui pose problème si les souris ne bénéficient pas de soins intensifs en post-opératoire (Fish *et al.*, 2009). Les hautes doses de morphine (20-50 mg/kg) augmenteraient la mobilité des souris (Patti *et al.*, 2005). De plus, la souris développerait une tolérance après des bolus répétés quotidiennement à 10 mg/kg de morphine (Tokuyama *et al.*, 1998).

Fentanyl (F) et apparentés :

Son action analgésique est 50 fois plus puissante que la morphine (Desfontis *et al.*, 2017) mais de moins de 30 minutes (Tranquilli *et al.*, 2007). Des doses allant de 0,02 à 0,64 mg/kg par voie SC sont indiquées pour la gestion de douleur d'origine cancéreuse (Mouedden *et al.*, 2005). Les patchs utilisés sur les grandes espèces sont non adaptés au gabarit de la souris en vue d'un surdosage de fentanyl (Fish *et al.*, 2009). Le fentanyl est surtout utilisé en association avec un neuroleptique tels que le dropréridol ou la fluanisone (Flecknell, 2016) : c'est la neuroleptanalgie (Desfontis *et al.*, 2017).

Les analogues tels que le sufentanil ou le remifentanil sont peu utilisés chez les rongeurs car ont une action plus courte encore ; cependant ils peuvent être utilisés en CRI afin de contrôler l'analgésie instantanément pendant une chirurgie (Flecknell, 2016).

Oxymorphone et hydromorphone :

Cette molécule est comparable à la morphine mais d'action plus courte d'où sa faible utilisation. Des formes encapsulées permettent tout de même de traiter des douleurs de longue durée chez la souris (Fish *et al.*, 2009).

Tramadol :

Cette molécule a également une action analgésique en inhibant les récepteurs sérotoninergiques et de la noradrénaline (Flecknell, 2016). Elle permet la gestion de douleur post-opératoire : on peut l'administrer par voie IV à 10 mg/kg ou par voie orale à 100 mg/kg chez la souris. Son élimination est rapide : sa concentration plasmatique lors d'une injection par voie IV est divisée par 1000 en moins de 2 heures (Beier *et al.*, 2007). Son action est dose dépendante mais aussi souche-dépendante (Symeon *et al.*, 2017).

(B) LES AGONISTES PARTIELS

Buprénorphine :

C'est un agoniste partiel des récepteurs μ et un antagoniste des récepteurs κ . Son affinité est très grande pour les récepteurs μ ce qui lui confère une longue action de 3 à 5 heures à la dose de 2 mg/kg chez la souris par voie SC (Gades *et al.*, 2000). Cependant, son action analgésique est moins grande que celle de la morphine et la buprénorphine semble atteindre vite un effet plateau pendant lequel il est impossible d'associer un autre agoniste μ si la douleur est toujours présente (Desfontis *et al.*, 2017). Des formulations avec une efficacité de 1 ou 2 jours ont été initiées pour les rongeurs afin de limiter les manipulations nécessaires aux injections mais aucune n'est encore commercialisée (Jirkof *et al.*, 2015).

Butorphanol :

Il agit comme agoniste partiel des récepteurs μ et agoniste entier des récepteurs κ (Desfontis *et al.*, 2017). Sa valence analgésique est faible et agit entre 1 et 2 heures (Gades, 2000). Son action est aussi sédative.

Nalbuphine et Pentazocine :

Des études sont rapportées chez le rat (Fish *et al.*, 2009).

Tableau IX : Posologies, voies d'administration, durée d'action des opioïdes chez la souris (Flecknell, 2016 ; Med'Vet)

Molécule	Spécialités injectables vétérinaires NDV	Dose chez la Souris (mg/kg)	Durée d'action (heures)	Voie d'injection
Buprénorphine	BUPRECARE BUPREDINE BUPRENODALE BUPAQ VETERGESIC	0,05-0,1	3-5	SC
Butorphanol	ALVEGESIC BUTADOR DOLOREX TORBUGESIC TORPHASOL TORPHADINE	1-2	1-2	SC
Morphine	/	2,5	2-4	SC
Fentanyl	FENTADON	/	/	SC, IP ?
Nalbuphine	/	2-4	4	IM ?
Oxymorphone	/	0,2- 0,5	4	SC ?
Pentazocine	/	5-10	3-4	SC
Tramadol	TRALIEVE TRAMADOG	5	/	SC (ou IP ?)

c) Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS ont trois rôles d'intensité différente selon la molécule : anti-pyrétique, anti-inflammatoire et analgésique (palier I et II). Leur action repose sur l'inhibition d'une enzyme, la cyclo-oxygénase (COX), qui permet la synthèse de médiateurs de l'inflammation, les prostaglandines. Les COX 1 sont produites en permanence par toutes les cellules de l'organisme, les COX 2 sont induites par un foyer inflammatoire et récemment la COX 3 a été découverte (Shaftel *et al.*, 2003). Leurs effets secondaires tels que les ulcères gastriques ou une insuffisance rénale apparaissent en cas d'utilisation à long terme (Desfontis, 2017).

Méloxicam :

Seule molécule du groupe des oxicams commercialisée en médecine vétérinaire (Desfontis *et al.*, 2017), le méloxicam est efficace à 1,6 mg/kg administré toutes les 12 heures par voie SC dans la gestion de la douleur post-opératoire chez la souris. En effet, la cinétique d'élimination de ce composé est plus rapide que chez le rat (Chen *et al.*, 2016).

Carprofène et Kétoprofène :

Deux acides aryl-propioniques (Desfontis *et al.*, 2017) seraient intéressants en post-opératoire à dose élevée : une administration SC de 29 mg/kg ou 65 mg/kg respectivement agiraient pendant au moins 48 heures après une laparotomie chez la souris (Matsumiya *et al.*, 2012).

Paracétamol (ou acetaminophen en anglais) :

Cet acétanilide est intéressant car il agit dans les cellules par sa propriété basique. Il a une action centrale car il passe la barrière hémato-méningée : c'est le plus puissant des anti-pyrétiques parmi les AINS. Seul, le paracétamol semble non efficace en post-opératoire pour la souris même à forte dose (Matsumiya *et al.*, 2012). Associé à la morphine et au kétoprofène, il permet une analgésie multimodale et la diminution des doses de chaque composé (Miranda *et al.*, 2008).

Tableau X : Posologies des AINS utilisés chez la souris (Flecknell, 2016)

Molécule	Posologie (mg/kg)	Voie d'administration
Méloxicam	5	SC ou PO
Carprofène	5	SC
Kétoprofène	5	SC
Paracétamol	200	PO

A noter que ces 4 substances sont disponibles sous différentes dénominations ayant une AMM vétérinaire.

Pour conclure :

L'anesthésie gazeuse se développe par sa praticité et la qualité de réveil qu'elle offre aux animaux. Elle nécessite toutefois du matériel et une formation adéquate.

Les molécules injectables sont rarement utilisées seules afin de diminuer les effets secondaires et les doses. Concernant les analgésiques, les opioïdes injectés avant ou avec l'anesthésique permettent d'assurer une anesthésie chirurgicale. Les AINS gèrent surtout une douleur post-opératoire ; leurs doses sont variables selon les auteurs.

C. Les combinaisons d'anesthésiques utilisées chez la souris de laboratoire

Toute anesthésie repose sur un protocole élaboré en fonction du statut physiologique du patient et l'acte qu'il va subir. Le risque anesthésique est évalué avec un grade de 1 à 5 selon l'American Society of Anesthesiologists (noté ASA) pour les carnivores domestiques. Cette classification associe un risque de mortalité lié à l'anesthésie (ASA, consulté le 5/04/20).

Cette partie recense les associations anesthésiques pratiquées sur les souris. Toutes les études mentionnées sont réalisées sur des souris sauf mention contraire.

1. Association comprenant la kétamine

a) Kétamine/ xylazine et acépromazine

Dans la littérature, cette association a été souvent étudiée ce qui permet d'avoir des posologies sûres d'utilisation. Pour toutes ces publications, la voie d'injection privilégiée est la voie intra-péritonéale.

Tableau XI : Posologies étudiées pour l'association kétamine/xylazine dans la littérature et leurs effets (ACP = acépromazine, CRI= constant rate infusion : perfusion à débit constant)

Source	Kétamine (mg/kg)	Xylazine (mg/kg)	Autre (mg/kg)	Durée anesthésie (min)	Effets néfastes
Flecknell, 2016	80-100	10	/	20- 30	/
(Rebecca L. Erickson <i>et al.</i> , 2016)	80	8	-CRI 90 min : kétamine ou kétamine/xylazine -ACP : 0,1 ou 0,5	100 minimum imposées par la CRI	Augmentation fréquences respiratoire et cardiaque Faible mortalité
(Jaber <i>et al.</i> , 2014)	50 80 100 100	5 8 10 10	ACP : 1 ACP :1 ACP :1-2 /	/ 45 67 23	/ / Mortalité > 50% /
(Buitrago, 2008)	100	10	/ ACP : 3	52 74	/ Anesthésie chirurgicale de 25 minutes

			Buprénorphine : 0,05	37	/
(Xu <i>et al.</i> , 2007)	100	0,1 0,5 2,5 10	/	20 20 30 40	} Augmentation fréquence cardiaque
	50	2,5 10		30 40	
(Arras <i>et al.</i> , 2001)	100 150 100	20 30 25	/ / ACP :3	66 101 111	→ Réflexes persistants → Mortalité : 40 % → Anesthésie chirurgicale de 54 minutes

L'association kétamine/xylazine ne permet pas d'obtenir une anesthésie chirurgicale (Green *et al.*, 1981) mais une sédation pendant 20 à 100 minutes. Les fortes doses de kétamine peuvent être mortelles (Arras *et al.*, 2001). La xylazine peut induire une opacification oculaire passagère (Calderone *et al.*, 1986).

L'administration par voie SC serait plus sûre d'utilisation que la voie IP pour une même posologie des deux molécules (Levin-Arama *et al.*, 2016).

L'ajout d'acépromazine augmente la durée d'anesthésie et permettrait une anesthésie chirurgicale (Flecknell, 2016).

b) Kétamine/ médétomidine et usage de l'atipamézole

La kétamine s'associe également à la médétomidine qui est 10 fois plus affine (grâce à l'énantiomère dexmédétomidine) pour les récepteurs adrénergiques que la xylazine et présente moins d'effets secondaires (Virtanen, 1989). L'administration se fait couramment par voie intra-péritonéale mais Flecknell suggère également la voie sous-cutanée. L'anesthésie chirurgicale semble possible pour la majorité des souches de souris (Flecknell, 2016) mais ce protocole modérément analgésique permet surtout une contention des souris (Cruz *et al.*, 1998). Les posologies doivent être adaptées au sexe (Cruz *et al.*, 1998).

L'ajout d'atropine induit une hypertension supérieure à 80 mmHg; ce protocole ne doit pas être utilisé dans les études du métabolisme du glucose (Zuurbier *et al.*, 2014).

Tableau XII : Posologies pour l'association kétamine/ médétomidine /atipamézole dans la littérature

Source	Kétamine (mg/kg)	Médétomidine (mg/kg)	Atipamézole (mg/kg)	Durée anesthésie (min)	Effets néfastes
Flecknell, 2016	75	1	1 SC	20-30	/
Arras <i>et al.</i> , 2001	100	1 5	/	195 213	Mortalité 5% Mortalité 60%
Cruz <i>et al.</i> , 1998	35 40 75 150	0,5 1 1 1	/ 2-2,5 (femelle) 1-1,75 (mâle) / (voie non renseignée)	/ 23 32	Posologie faible pour les femelles Anesthésie trop profonde
(Taylor <i>et al.</i> , 2000)	76 SC 38 SC	1 SC 1 SC	1 SC 1 SC	Femelle : 158 Mâle : 108 Femelle : 91 Mâle : 85	

L'avantage de la médétomidine est son antidote : l'atipamézole. Cette molécule permet un réveil plus rapide des animaux lors de courtes interventions (Cruz *et al.*, 1998). Selon le Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP) de l'ATIPAM NDV, l'atipamézole peut être injecté 20 minutes après administration de médétomidine. Sa dose est à adapter à celle de médétomidine injectée.

Flecknell propose dans le cas de l'association kétamine/ médétomidine d'injecter l'atipamézole 30 à 40 minutes après induction afin de ne pas laisser l'animal sous seule action de la kétamine à 1mg/kg par voie sous-cutanée. D'autres auteurs l'injectent par voie IP plus tardivement soit 50 minutes après induction à la même dose que la médétomidine (0,25 mg/kg). Cette molécule impliquerait une hyperventilation visible par une augmentation de la fréquence respiratoire post-injection (Kiliç and Henke, 2004). Elle diminuerait la mortalité et la morbidité (Taylor *et al*, 2000).

c) Kétamine et benzodiazépines

L'association kétamine/ diazépam minimise l'effet hypotenseur par rapport à l'association kétamine/ xylazine (Wixson *et al.*, 1987) ; elle permet une anesthésie non chirurgicale d'environ 30 minutes à 70/2 mg/kg respectivement par voie IP (Flecknell, 2016).

L'alliance fentanyl/ kétamine et midazolam entraîne une hypotension (inférieure à 60 mmHg) (Zuurbier *et al.*, 2014).

2. Association tilétamine/ zolazépam

Le ZOLETIL NDV proposé par Virbac est actuellement la seule spécialité vétérinaire injectable offrant un mélange de deux molécules. Elle ne confère qu'une courte anesthésie avec une conservation de plusieurs réflexes tels que les réflexes cornéen et podal, de toux et de déglutition ce qui rend compliqué l'appréciation de la profondeur de l'anesthésie. Flecknell recommande une posologie de 80 mg/kg par voie IP. Marie-Aude Cheminant de l'UTE-IRS de Nantes a obtenu une mortalité de 100 % par arrêt cardio-respiratoire immédiat en l'appliquant à 50 mg/kg sur des souris Balb/c et C57 lors d'instillations nasales (voir partie II).

Il est possible d'associer diverses molécules à l'association tilétamine/ zolazépam pour augmenter la durée de l'anesthésie :

- la médétomidine à 0,2-0,4 mg/kg avec le zolazépam-tilétamine à 20-40 mg/kg par voie IP et le butorphanol à 3 mg/kg en SC. Les fréquences respiratoire et cardiaque sont stables, le taux de survie est de 100%. La durée d'anesthésie varie de 73 à 163 minutes (Cagle, 2017).
- La xylazine à 7,5 mg/kg avec une association tilétamine/ zolazépam à 25 mg/kg par voie IM permet de renforcer l'action analgésique de la xylazine (Khokhlova *et al.*, 2017).

3. Association alfaxalone/ xylazine

Une récente étude a testé l'alliance alfaxalone/ xylazine sur différentes souches de souris. Selon la voie d'administration, le type d'anesthésie obtenu diffère : la voie SC permet la laparotomie tandis que la voie IP en augmente la mortalité. Le sexe et la souche joueraient également sur la réponse anesthésique (Erickson *et al.*, 2019).

4. Inclusion des opioïdes

a) Exemple de neuroleptanalgie : fentanyl/ fluanisone

L'association fentanyl/ fluanisone est présente dans la spécialité HYPNORM sans AMM française. Certains auteurs l'injectent en IM (Brammer, West and Allen, 1993), d'autres en IP à 0,4ml/kg (Flecknell, 2016). Du midazolam ou du diazépam est communément ajouté à 5 mg/kg pour obtenir une anesthésie chirurgicale (Flecknell, 2016).

b) Association propofol/ fentanyl

Le propofol a une action courte de l'ordre de 10 minutes. Son désavantage est son injection obligatoire par voie veineuse (Flecknell, 2016). Des protocoles l'utilisent avec un dérivé opioïde par voie intra-péritonéale (Alves *et al*, 2007).

Tableau XIII : Résultats de l'article Intraperitoneal propofol and propofol fentanyl, sufentanil and remifentanil combinations for mouse anaesthesia (Alves *et al.*, 2007)

Combinaison	Doses (mg/kg)	RR-	T1-T0 (min)	PWR-	T2-T0 Temps chirurgical		T4-T1 Durée anesthésie	
					T2-T0 (min)	Death rate	T3-T2 (min)	T4-T1 (min)
Propofol	50	0/4	0	0/4	0	0/4	—	—
	75	2/4	4±1	1/4	0	1/4 ^a	—	10
	100	1/4	5	0/4	0	0/4	—	15
	200	3/4	4±1	0/4	0	0/4	—	24±1
Propofol-fentanyl	50/0.4	1/4	3	0/4	0	0/4	—	4
	100/0.2	2/4	4±1	1/4	23	1/4 ^b	—	23
	100/0.4	2/4	6±2	0/4	0	0/4	—	5±3
	200/0.2	4/4	3±0	0/4	0	0/4	—	29±8
	200/0.4	4/4	5±4	1/4*	5	2/4 ^c	—	50±25
Propofol-sufentanil	50/0.1	0/4	0	0/4	0	0/4	—	—
	100/0.05	2/4	4±1	0/4	0	0/4	—	17±11
	100/0.1	3/4	4±1	0/4	0	0/4	—	8±2
	200/0.05	4/4	3±1	4/4	10±2	3/4 ^d	20	60
	200/0.1	4/4	3±1	2/4	16±11	2/4 ^e	20±5 [†]	30±6
Propofol-remifentanil	50/0.2	2/4	4±0	0/4	0	0/4	—	3±3
	50/0.5	3/4	4±1	0/4	0	0/4	—	10±11
	50/1	4/4	2±1	1/4	2	0/4	15	24±10
	75/0.2	3/4	3±1	1/4	2	0/4	10	6.0±2
	75/0.5	4/4	3±1	2/4	5±1	0/4	3.5±2	15±10
	75/1	4/4	3±1	1/4	3	0/4	10	14±11

Times between loss of PWR and death: a – 4 min; b – 4 min; c – 2.5±0.7 min; d – 20.7±13.2 min; e – 26±8.5 min

*We considered PWR positive in this animal due to the difficulty in differentiating a positive foot pinch response from spontaneous muscle spasm

[†]These animals died after recovery of PWR. Time data showed in minutes (average±standard deviation)

Ces résultats démontrent que l'association propofol/ opioïde est indiquée pour de courtes anesthésies allant de 4 à 60 minutes sans acte chirurgical. La mortalité associée est faible mais non nulle. Seul l'opioïde fentanyl est disponible avec une AMM vétérinaire.

L'alliance propofol 35 mg/kg, fentanyl 1,2 mg/kg et midazolam 20mg/kg par voie IP offre une anesthésie neutre aux niveaux des variables hémodynamiques (Zuurbier *et al.*, 2014).

Dans une autre étude, l'alliance propofol (75mg/kg)/ médétomidine (1-2 mg/kg)/ fentanyl (0,1-0,2 mg/kg) apparaît sûre et intéressante pour avoir une fenêtre chirurgicale. L'atout de la médétomidine reste la possibilité d'antagoniser l'anesthésie (Alves *et al.*, 2009).

c) Pré-médication à la buprénorphine

Une étude sur des rats a mis en évidence l'utilité de la buprénorphine dans l'obtention d'une anesthésie chirurgicale avec l'association kétamine/ médétomidine. Elle est injectée en SC une heure avant induction (Hedenqvist *et al.*, 2000).

d) Autres protocoles testés

Allier le fentanyl à 0,06 mg/kg et le métomidate à 60 mg/kg par voie SC permet d'obtenir une anesthésie chirurgicale de plus de deux heures (Green *et al.*, 1981).

L'association médétomidine 0,3mg/kg, midazolam 4 mg/kg et butorphanol 5 mg/kg agirait comme l'association kétamine /xylazine classiquement utilisée et offrirait une anesthésie de 40 minutes avec environ un délai de 30 minutes pour un acte chirurgical (Kawai *et al.*, 2011).

L'ajout de butorphanol à l'association kétamine/ médétomidine permettrait une meilleure analgésie. Toutefois, une assistance ventilatoire semble nécessaire (Bauer *et al.*, 2019).

Pour conclure sur les protocoles anesthésiques :

Ils sont nombreux avec toutefois une banalisation des protocoles alliant kétamine et alpha2 agoniste intéressants pour leur réversibilité. Toutefois certains auteurs mettent en garde sur cette alliance qui provoque de grandes perturbations hémodynamiques et donc ont un impact sur l'organisme de la souris (Zuurbier *et al.*, 2014). Le choix du protocole doit toujours être fait selon l'acte réalisé, la procédure expérimentale et s'il est d'ordre chirurgical ou pas.

La possibilité d'allonger la durée de l'anesthésie peut se faire par des injections répétées ou bien la pose d'une CRI par voie IP (Zuurbier *et al.*, 2014).

Enfin les études les plus récentes indiquent des différences de réaction entre les souches des souris (Zuurbier *et al.*, 2014) voire le sexe (Erickson *et al.*, 2019) ce qui amène à penser qu'il n'y a pas une unique posologie pour l'espèce souris.

D. Notion de wash-out

Le métabolisme des molécules anesthésiques diffère selon l'espèce, la voie d'administration, la nature moléculaire et la dose. Le foie et le rein interviennent dans leur métabolisation et leur élimination (Puyt, 2016). En pharmacocinétique, tout xénobiotique est caractérisé par un temps de demi-vie caractérisant sa concentration dans le temps après administration. Le RCP du FENTADON NDV indique que l'élimination du fentanyl chez le chien s'effectue entre 45 minutes et 3 heures. Pour le PROPOVET NDV, le propofol a un temps de demi-vie de 10 minutes après injection puis sa concentration plasmatique diminue plus lentement ensuite.

Le wash-out ou lavage est une période durant laquelle les individus d'un essai clinique ne reçoivent aucun traitement médicamenteux actif afin d'éliminer les médicaments précédents pour s'affranchir de toute interaction (URC, consulté le 5/04/20). Dans la littérature, on trouve des périodes de wash-out de 3 jours (Xu *et al.*, 2007), 5 jours (Cruz, Loste and Burzaco, 1998) ou bien de 10 jours (Alves *et al.*, 2007) pour les protocoles d'anesthésie des souris mais sans réel fondement.

E. Réglementation de la pharmacie vétérinaire et usage des stupéfiants dans les établissements d'expérimentation animale (*Arrêté du 1^{er} février 2013 relatif à la délivrance et à l'utilisation de médicaments employés par les établissements agréés en tant qu'utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques*)

1. La cascade vétérinaire

La réglementation de la pharmacie vétérinaire et du médicament est codifiée dans le Code Rural et de la pêche maritime et dans le Code de la Santé Publique (CSP).

L'usage de médicaments en médecine vétérinaire doit respecter la cascade vétérinaire de l'article L.5143-4 du CSP stipulant qu'un médicament vétérinaire pour l'espèce cible et la visée thérapeutique doit être prescrit en priorité. En cas d'indisponibilité de médicament répondant à ces deux contraintes, on peut utiliser un médicament selon l'ordre suivant :

- pour l'espèce cible avec une autre visée thérapeutique **ou** pour la visée thérapeutique dans une autre espèce
- dans une autre espèce **et** pour une autre visée thérapeutique
- un médicament humain **ou** un médicament vétérinaire valable dans un autre Etat membre, pour la même espèce ou pour une autre espèce, pour l'affection concernée ou pour une affection différente
- une préparation magistrale vétérinaire

La préparation magistrale vétérinaire peut être administrée lors de soins aux animaux d'expérimentation mais ne peut en aucun cas être utilisée dans une procédure expérimentale.

Enfin, toute administration médicamenteuse aux animaux pour des soins quotidiens doit faire l'objet d'une prescription par un vétérinaire ; ce qui diffère de l'usage lors de procédures expérimentales.

2. Conditions d'acquisition, de détention et d'usage

Par dérogation prévue à l'article L5144-3 du CSP, les établissements d'expérimentation animale agréés peuvent avoir accès aux médicaments vétérinaires autorisés en France et dans un Etat membre de l'UE (par application de la Directive 2001/82/CE) ainsi qu'aux médicaments à usage humain, les détenir et les utiliser en interne. Cette utilisation comprend les procédures expérimentales et les soins des animaux (Article 1).

L'acquisition des médicaments cités ci-dessus est autorisée auprès des exploitants, des dépositaires, de centrales d'achat ou de personnes aptes à les vendre au détail (officines) (Article 3). Pour toute importation de médicaments, une autorisation de l'Agence Nationale du Médicament et de la Santé (ANSM) est requise (Anses, 2017).

Une salle doit être dédiée à la détention des médicaments. La manipulation des médicaments revient à la personne responsable de la pharmacie ou un personnel sous son autorité.

Toute entrée et sortie d'un médicament doit être réalisée par une personne ayant l'autorisation et notée dans un registre des médicaments de façon chronologique. Ces registres sont conservés dix ans. Pour chaque entrée, sortie, vol ou perte de produits (date de péremption atteinte), il doit être noté :

- « nom du responsable de la procédure expérimentale dans laquelle est utilisé le médicament ;
- nom du médicament ;
- quantités entrées et quantités retirées du stock et numéro de lot ;
- date de délivrance ;
- identification des animaux utilisés dans la procédure expérimentale indication du traitement. » (Article 4)

3. Rôle de la personne responsable de la pharmacie

Tout établissement d'expérimentation animale doit désigner une personne en charge de la pharmacie. La personne en charge de la pharmacie est déclarée auprès de la DDPP et de l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) (Article 2). Ses missions sont la gestion de :

- l'approvisionnement : autorisé depuis les structures déjà évoqués ci-dessus.
- la gestion des stocks et la traçabilité : la quantité de médicaments détenue doit être en adéquation avec le niveau d'activité de la structure de recherche animale.
- l'usage de ces médicaments doit respecter la cascade thérapeutique définie dans l'Article L5143-4 du CSP.

4. Particularités des molécules stupéfiantes

Certaines substances médicamenteuses sont classées « vénéneuses » dans l'article du 21 janvier 1957 portant inscription aux tableaux des substances vénéneuses. L'article L5132-1 du CSP précisent plusieurs catégories : les stupéfiants, les psychotropes et les substances des listes I et II. Cette catégorisation implique des règles de détention, d'utilisation, de prescription et de délivrance précises.

Le 22 février 1990, trois Arrêtés classent les molécules pharmaceutiques selon les appellations spécifiées dans l'article cité précédemment. Cependant la réglementation évolue et régulièrement de nouvelles substances sont ajoutées par modifications successives de ces Arrêtés.

Tableau XIV : Classement réglementaire des substances vénéneuses utilisables en médecine humaine et vétérinaire évoquées dans la partie précédente (legifrance, consulté le 4/04/20)

Arrêté concerné	Classe	Substances et préparations contenant ces substances (date du classement réglementaire)
<i>Arrêté du 22 février 1990 fixant la liste des substances classées comme stupéfiants</i> (dernière modification le 20 décembre 2019)	Stupéfiant	*Tilétamine et ses sels, à l'exception de leurs préparations injectables (2003) *Midazolam PO (2012) *Kétamine (2017) *Morphine sous certaines présentations (1990) *Fentanyl (1990) *Remifentanil (2000) *Sufentanil (1990) *Oxymorphone (1990) *Hydromorphone (1990) *médicaments PO à base de Buprénorphine (2012) *Pentazocine (2000)
<i>Arrêté du 22 février 1990 fixant la liste des substances psychotropes</i> (dernière modification le 23 décembre 2019)	Psychotrope	*Midazolam (1990) *Phénobarbital (1990) *Buprénorphine (1990) *Butorphanol non injectable (2009)
<i>Arrêté du 22 février 1990 portant inscription sur les listes I et II des substances vénéneuses définies à l'article R.5204 du code de la santé publique- Article 1</i>	Liste I	*Atropine (1957) * Préparations injectables contenant de la Tilétamine (2003) *Acépromazine (1988) *Diazépam (1964) *Dropéridol (1966) *Médétomidine et Dexmédétomidine (2012) *Zolazepam (1998) *Propofol (1986) *Alfaxalone (1973) *Etomidate (1982) *Isoflurane (1984) *Bupivacaïne, préparations ophtalmiques (1981) *Tramadol (2010) *Lidocaïne (1980) *Morphine sous certaines présentations non injectables (2014) *Butorphanol (2009) *Nalbuphine (1987) *Meloxicam (1997) *Carprofène (1999)
<i>Arrêté du 22 février 1990 portant inscription sur les listes I et II des substances vénéneuses définies à l'article R.5204 du code de la santé publique- Article 2</i>	Liste II	*Ropivacaïne (2009) *Bupivacaïne (1981) *Paracétamol (2016) *Kétoprofène (1997)

Les psychotropes et les stupéfiants ont des effets psychoactifs et peuvent entraîner une pharmacodépendance. Leur usage est limité à l'anesthésie, la gestion de la douleur ou l'anxiété en médecine (ANSM, page consultée le 3/04/2020). Quatre substances stupéfiantes commercialisées dans des spécialités vétérinaires sont concernées en tant que spécialités stupéfiantes :

- la kétamine dans les spécialités ANESKETIN NDV, IMALGENE 1000 NDV et CLORKETAM 1000 NDV
- la tilétamine dans la spécialité ZOLETIL NDV

- la méthadone dans la spécialité COMFORTAN NDV
- le fentanyl dans la spécialité FENTADON NDV

L'article R. 5132-75 du CSP rend obligatoire une autorisation émise par l'ANSM à des fins de détention et d'utilisation de stupéfiants. Pour leur importation, l'ANSM et l'Anses doivent valider une autorisation (Anses, 2017). Les stupéfiants sont conservés seuls sans autre produit, sous clé avec un dispositif d'alarme selon l'article R. 5132-80 du CSP et l'Arrêté du 22 février 1990 relatif aux conditions de détention des substances et préparations classées comme stupéfiants.

Un registre leur est spécialement attribué qui peut être de format papier ou électronique. Leurs entrée et sortie sont inscrites dans un registre spécifique, des balances mensuelle et annuelle doivent être réalisées (article R. 5132-81 et 83 du CSP)

Tout vol ou détournement d'un stupéfiant doit être signalé à la police, à l'inspection régionale de la pharmacie et à l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé selon l'article R. 5132-80 du CSP et indiqué dans le registre dédié.

On notera le cas particulier des médicaments contenant de la tilétamine qui sont considérés comme des stupéfiants suite à l'Arrêté du 31 juillet 2003 portant application de la réglementation des stupéfiants aux médicaments à base de kétamine et aux médicaments à base de tilétamine. Ils doivent donc être détenus avec les autres stupéfiants et déclarés en cas de vol. Cependant, aucune inscription des entrées et sorties des spécialités injectables contenant de la tilétamine ne doit être inscrite dans le registre des stupéfiants ; leurs prescription et délivrance respectent celles vouées à la liste I dont elles font parties.

F. Paramètres de monitoring chez les rongeurs

Toute anesthésie générale induit une dépression multi-systémique se traduisant par de l'hypothermie, une hypotension, une hypoventilation associée plus ou moins à de la douleur (Flecknell, 2016). Des risques supplémentaires sont présents chez un animal pathologique tel qu'un insuffisant hépatique, rénal ou cardiaque.

En médecine vétérinaire, anesthésier un animal est un acte commun nécessitant toutefois une capacité à fournir des moyens de suivi de cette anesthésie (ACVA, 2009), interpréter les anomalies et intervenir en cas de problème per-anesthésique (Flecknell, 2016). Pour cela, divers appareils de monitoring existent pour suivre plusieurs paramètres que l'on va présenter par la suite et avertir le manipulateur en cas d'anormalités par une alarme. Ces appareils électroniques doivent être adaptés (mais ne le sont pas toujours) à l'espèce souris afin de recenser des données exactes ; le matériel utilisé en médecine humaine est à éviter. Ce matériel spécialisé est onéreux ; c'est pourquoi le monitoring peut déjà s'effectuer en grande partie par une évaluation clinique de l'animal anesthésié.

Ces appareils sont une grande aide dans le monitoring mais deux points sont à rappeler :

- un examen clinique doit toujours être effectué avant une anesthésie pour avoir les valeurs de référence des paramètres vitaux de l'individu (ASA, consulté le 5/04/20)
- le manipulateur doit également garder un esprit critique vis-à-vis de la machine (valeurs déclenchant l'alarme, la bonne pose du dispositif et son adaptation à l'espèce, calibrage et entretien du l'appareil, etc).

1. Température

Toute anesthésie entraîne une baisse de la température corporelle par dépression des centres régulateurs de la température.

La souris est de base très sujette à l'hypothermie car son métabolisme est rapide et le ratio surface corps/volume est grand ce qui accroît les pertes de chaleur. Si une anesthésie gazeuse est en place, l'administration des gaz est un facteur supplémentaire de refroidissement par les voies respiratoires (Flecknell, 2016).

Toute hypothermie per-anesthésique doit être évitée car elle allonge la phase de réveil (Pottie *et al.*, 2007), elle peut interférer dans les données d'étude (Schuster *et al*, 2018) voire être létale (Flecknell, 2016).

Différentes méthodes de suivi de la température corporelle existent :

- usage d'un thermomètre rectal : il doit être adapté aux rongeurs. La température rectale est une bonne approximation de la température centrale (Schuster *et al*, 2018). L'acte est simple et facilement répétable mais présente quelques inconvénients. Ainsi, il faut connaître la plus petite valeur détectable par l'appareil (souvent de 35°C) et répéter fréquemment les mesures pour optimiser le suivi ce qui peut provoquer des lésions de la muqueuse rectale.
- usage d'une sonde thermique. Elle peut être placée dans le rectum ou bien dans l'œsophage. En position intra-rectale, la présence de fèces peut biaiser les mesures. Concernant la position de la sonde en amont du tube digestif, elle doit être placée en position basse pour ne pas interagir avec le refroidissement des gaz respiratoires circulant dans les voies respiratoires hautes.
- usage d'une sonde mesurant la température à la surface du corps. Elle peut être placée au niveau de l'espace interdigitée (Flecknell, 2016).
- usage d'un implant télémétrique permettant de suivre la température corporelle et d'autres paramètres par voie sanguine (DSI, consulté le 6/04/20) ou intra-péritonéale (Schuster *et al*, 2018).

La prévention de l'hypothermie, inéluctable chez un rongeur dès induction anesthésique, doit passer par l'instauration de moyens de réchauffement (Flecknell, 2016). La chute de température peut atteindre les 11 % sur une anesthésie de 40 minutes (Schuster *et al*, 2018). Il a été montré sur des rats qu'une exposition à l'air chaud avant l'anesthésie et l'usage d'un coussin chauffant per-anesthésique conservait la température centrale pendant et après l'anesthésie (Schuster *et al*, 2018).

Une couche d'un matériel isolant de type papier bulle peut entourer la souris pour limiter les pertes de chaleur. Les tapis chauffants avec ou sans thermostat, les lampes chauffantes ou des bouillottes peuvent être utilisés. Il est judicieux de mesurer la température émise par ces sources de chaleur pour en vérifier l'efficacité et prévenir les brûlures (Flecknell, 2016). Des tapis mesurent la température par sonde rectale comme le Thermostar® et ajustent la chaleur délivrée (Intellibio, consulté le 6/04/20) ; d'autres fonctionnent par système d'air ou d'eau circulant : ces deux options sont onéreuses. Enfin une couveuse peut être nécessaire en post-opératoire (D. Bouard, 2019).

2. Appareil respiratoire

La fonction respiratoire des souris est peu caractérisable à l'œil nu sur souris vigile ; la pléthysmographie est une approche utilisée dans des études sur l'asthme et permet la mesure de paramètres variés sur souris vigiles. Par corrélation entre les variations de pression des différents compartiments, on obtient les variations de volume du cycle respiratoire. La fréquence respiratoire, les temps inspiratoires et expiratoires et les volumes pulmonaires sont obtenus par cette méthode validée non invasive chez la souris (Hamelmann *et al.*, 1997).

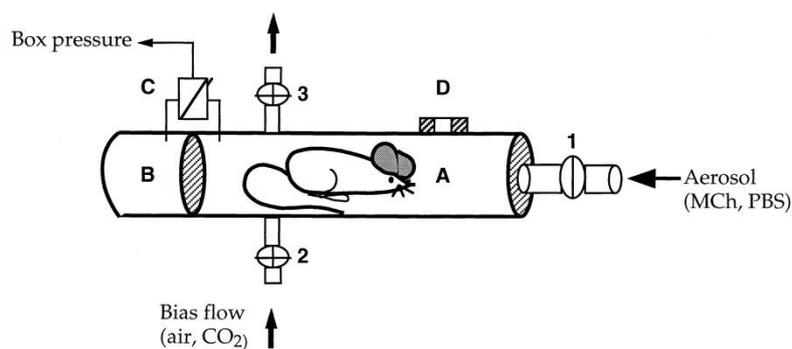


Figure 19 : Schéma du principe d'un dispositif pour pléthysmographie (Hamelmann *et al.*, 1997)

De nombreuses molécules anesthésiques induisent une dépression respiratoire comme mentionné dans le chapitre précédent. Ceci peut induire une diminution de la fréquence respiratoire, une hypoxie et une hypercapnie. Les tissus seront donc moins bien oxygénés dont le cerveau qui sera endommagé en cas de sous- ou non-oxygénation prolongée. En cas de fortes dépressions respiratoires, du doxapram peut être injecté à la posologie de 5-10 mg/kg par voie IV, IM ou IP ; son action est de 15 minutes (Flecknell, 2016). Le doxapram entraîne des effets cardiovasculaires sur des souris ayant reçu de la morphine (Plevry, 1978).

a) Une évaluation clinique simple de la fonction respiratoire

La souris active a une fréquence respiratoire très élevée (60-220 mvts/min). Lors d'anesthésie, les mouvements respiratoires sont bien visibles à l'œil et permettent de détecter des modifications de la courbe respiratoire, de l'amplitude et du rythme telles qu'une dyspnée voire une apnée. La fréquence respiratoire peut également être appréciée avec une sonde placée à proximité de la narine de la souris (Arras *et al.*, 2001).

Pour apprécier le bon échange des gaz sanguins dans les poumons, une couleur pâle voire bleutée des muqueuses signe une hypoxie et une hypoxémie graves.

En cas de modification de la courbe respiratoire sur une souris non intubée, il est compliqué d'intervenir. La présence de sécrétions dans l'appareil respiratoire peut empêcher la circulation de l'air et entraîner la mort de l'animal, d'où l'intérêt d'administrer de l'atropine, déjà citée pour son action anticholinergique, en début d'anesthésie (Flecknell, 2016).

b) L'oxymétrie de pouls

L'oxymètre mesure le pourcentage de saturation du sang artérielle en oxygène, notée (SpO₂) en évaluant le degré d'absorption de la lumière par l'hémoglobine dans les tissus. Le capteur est placé sur une zone glabre : la langue, la vulve, les coussinets, la queue ou les oreilles par exemple. Cette saturation en oxygène doit se situer au-dessus de 95% ; inférieure à 90%, il faut d'abord vérifier le bon positionnement du capteur sinon savoir réagir.

L'oxymètre fournit plusieurs informations : la SpO₂, la fréquence cardiaque et une courbe reflétant la circulation sanguine et donc la perfusion tissulaire. Une variation des deux précédents paramètres peut coïncider avec des variations de pression artérielle et/ou de l'activité cardiaque (Flecknell, 2016).

Aujourd'hui les appareils proposés offrent les données de plusieurs paramètres. Par exemple, Le MouseOx© de Starr Life Sciences Corporation permet de suivre les fréquences cardiaque et respiratoire, la SpO₂ et la température corporelle sur rat et souris, anesthésiés ou non. Il est relié au logiciel informatique adéquat. Le PhysioSuite© de Kent Scientific Corporation propose également une plateforme sur laquelle on peut ajouter divers modules selon le capteur connecté : température, oxymètre de pouls, capnographe et assistance ventilatoire.

c) La capnographie

Le capnographe permet de suivre les échanges pulmonaires en dioxyde de carbone (CO₂). Il donne une valeur chiffrée en millimètre de mercure (notée mmHg) qui reflète la quantité de gaz présente dans les alvéoles pulmonaires et une courbe permettant de suivre la teneur du gaz dans les poumons selon le temps respiratoire, inspiration ou expiration (voir figure 19).

Les valeurs d'EtCO₂ (end tidal volume) doivent osciller entre 35 et 45 mmHg. Des changements de la forme de la courbe doivent avertir le manipulateur pour en déterminer l'origine : un espace mort trop grand, une réinhalation des gaz expirés, une anesthésie trop légère, des modifications respiratoires voire cardiaques.

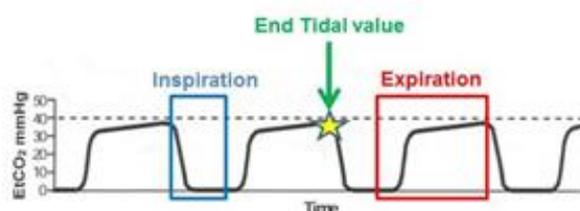


Figure 20 : Courbe normale du CO₂ expiré au cours du temps (Bound Tree, consulté le 10/04/20)

Le capteur doit être inséré à proximité de la sonde endotrachéale et requiert donc une intubation. Pour les souris, le capteur analyse des petits volumes expirés de l'ordre de 10-20ml/min (Flecknell, 2016).

d) Les gaz sanguins

La méthode la plus précise afin de suivre les échanges gazeux est de doser les gaz respiratoires dans le sang artériel. Au vu de la taille de la souris, cette méthode est donc compliquée excepté si un cathéter artériel est posé dans l'artère carotide droite par exemple (Arras *et al.*, 2001). Des essais de mesure de la concentration en oxygène et en CO₂ transcutanés semblent fructueux chez le lapin sauf pour des valeurs élevées qui sont sous-évaluées par cette technique (Barter and Hopper, 2011).

3. Appareil cardio-vasculaire

a) Fréquence cardiaque

La fréquence cardiaque de la souris (325-780 btts/min) peut s'apprécier en palpant le thorax. Cependant, il est difficile de compter le nombre de battements et d'évaluer la fréquence même avec un stéthoscope. La palpation du pouls est également peu réalisable chez les rongeurs (Fish *et al.*, 2009). Une augmentation de la fréquence cardiaque peut signer une action chirurgicale douloureuse ce qui peut amener à augmenter la dose d'analgésique. En cas de ralentissement cardiaque sévère, un massage cardiaque en appuyant sur le thorax avec le pouce peut être effectué (Flecknell, 2016). La fréquence cardiaque peut être mesurée avec un électrocardiographe en plaçant les électrodes au niveau des membres de la souris.

b) Electrocardiographie

L'électrocardiogramme (noté ECG) permet de suivre l'activité électrique du cœur. Il est surtout sollicité pour de longues chirurgies ou des chirurgies intra-thoraciques. Une première méthode non invasive permet d'obtenir un ECG sur animal vigile par le biais de plateformes qui enregistrent l'activité cardiaque avec une fréquence de 2 kHz. Des études utilisent déjà ce dispositif ECGenie (Rebecca L. Erickson *et al.*, 2016). Une plateforme placée à proximité de l'animal recueille directement les données : les manipulations répétées n'ont plus lieu ce qui diminue le stress des souris et est en faveur du bien-être animal pendant les longues études.

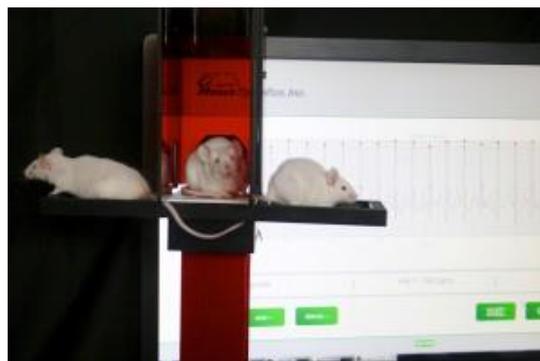


Figure 21 : Dispositif ECGenie (Mouse Specifics, consulté le 10/04/20)

L'ECG peut être obtenu en posant 3 électrodes ou aiguilles au niveau des 2 plis axillaires et du pli inguinal gauche pendant l'anesthésie de la souris le tout connecté et relié à un électrocardiographe adapté aux rongeurs. (Leal *et al.*, 2006). Cette méthode est communément utilisée sur les carnivores domestiques car simple à installer. Mais les rongeurs délivrent un message électrique de trop faible amplitude pour être détecté et transcrit par les appareils non adaptés (Flecknell, 2016).

D'autres méthodes sont plus invasives comme la pose d'un implant télémétrique nécessitant une chirurgie et une anesthésie : il permet de mesurer divers paramètres sur un animal vigile. On peut citer l'implant HD-X11© de DSI qui mesure l'ECG, la pression artérielle et l'activité de l'animal.

c) Pression artérielle

Des techniques directes et indirectes sont disponibles pour mesurer la pression artérielle (notée PA). La méthode de référence reste la pose d'un cathéter artériel. Concernant la souris, aucune artère n'est accessible comme une artère fémorale ou centrale auriculaire chez le lapin. Une chirurgie est donc nécessaire pour cathétériser une artère carotide par exemple (Xu *et al.*, 2007) et obtenir la pression artérielle en continu. Précédemment, la pose d'un implant télémétrique a prouvé son usage ici avec les mêmes conditions chirurgicales.

Les mesures indirectes peuvent se faire par l'intermédiaire de brassard tel que le PetMap disponible chez les carnivores domestiques ou bien la sonde Doppler, efficace sur les rats au niveau de l'artère caudale (Flecknell, 2016). Une étude a mesuré la PA par une technique non invasive en adaptant un dispositif pré-existant afin que les appareils puissent relever et enregistrer des valeurs précises (Thal and Plesnila, 2007). L'inconvénient reste un relevé intermittent de la PA ne permettant pas un suivi continu du paramètre.

Une pression artérielle basse est difficilement traitable en per-opératoire chez les rongeurs car la voie veineuse n'est pas toujours accessible et les autres voies d'injection n'offrent pas une absorption rapide. Cet incident doit être prévenu par une fluidothérapie par voie IP ou SC à base de Chlorure de sodium (noté NaCl) à 0,9% ou bien du NaCl à 0,18% avec du dextrose à 4% en voie SC à 10 mL/kg (Flecknell, 2016).

4. Evaluation de la profondeur de l'anesthésie

a) Théorie de la profondeur anesthésique

La profondeur de l'anesthésie s'évalue par les variations de plusieurs paramètres : la perte de conscience, l'absence ou non de réflexes à un stimulus douloureux, des changements de tonus musculaire, de la courbe et la fréquence respiratoire, de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle (Flecknell, 2016). Quatre stades anesthésiques sont décrits selon l'état de ces paramètres (voir figure 21). Lors d'une anesthésie générale, on souhaite atteindre le stade III : il se découpe en quatre plans dont le deuxième permet une chirurgie.

STADES	RESPIRATION	TONUS MUSCULAIRE	DIAMETRE PUPILLAIRE **	REFLEXES					
				Laryngé	Oculo-Palpébral*	Cornéen *	Photomoteur	Retrait	
Stade I analgésie	Normale régulière								
Stade II Excitation	Irrégulière								
Stade III Anesthésie	Plan 1 Anesth Légère		Lente régulière						
	Plan 2 Anesth Chirurgicale		Lente régulière						
	Plan 3 Anesth profonde		Devient abdominale						
	Plan 4		Abdominale						
Stade IV Paralysie bulbaire	Apnée								

*Réflexes annulés si kétamine**non pertinent avec les anticholinergiques et les dissociatifs (ex : kétamine)

Figure 22 : Signes de Snow (SBEA, 2018)

b) Comment l'évaluer en pratique ?

Le tonus musculaire diminue au cours d'une anesthésie : après induction anesthésique, la souris va perdre l'équilibre et sa mobilité pour se retrouver en décubitus ventral ou latéral : c'est la perte du « righting reflex », l'incapacité de se remettre sur ses quatre pattes et elle ne manifeste aucune résistance si on la place sur le dos (Flecknell, 2016). Le tonus de la mâchoire est peu évaluable chez les rongeurs (Fish *et al*, 2009), il doit être absent pour intuber l'animal.

Concernant le globe oculaire, trois altérations sont présentes :

- le réflexe palpébral est testé en tapotant au niveau des deux canthus de l'œil. Si l'animal cligne de l'œil alors il ne dort que superficiellement. Chez les rongeurs, il est difficile de l'évaluer. Le choix de l'anesthésique influe sur la disparition du réflexe palpébral (Fish *et al*, 2009).
- le basculement du globe oculaire et le diamètre pupillaire ne sont pas évaluables chez la souris (Flecknell, 2016).
- le réflexe cornéen est testé en touchant la cornée avec à l'aide d'un écouvillon humide (Flecknell, 2016) ; une étude l'a évalué en insufflant un petit flux d'air à l'aide d'une pipette Pasteur sur l'œil de souris (Kawai *et al.*, 2011) mais n'indique pas la fiabilité de ce paramètre.

La cornée peut être protégée avec des larmes artificielles du type OCRYGEL NDV. Une opacification blanchâtre cornéenne peut être passagère au cours d'une anesthésie.

Une anesthésie chirurgicale nécessite en plus de la narcose d'une valence analgésique. Il faut vérifier l'absence de réaction du système nerveux à un stimulus douloureux. Pour ce faire, on peut pincer différentes zones telles que les oreilles, les espaces interdigités des membres thoraciques et pelviens ou la queue. Tout retrait de la patte ou vocalise indiquera un stade anesthésique trop léger. Une stimulation par incision cutanée ou musculaire, par clampage de structures vasculaires peut également être source de douleur et doit être surveillé. Cependant, le niveau d'absence de réponse aux stimuli n'est pas corrélé à la perte de conscience.

Chez la souris, sa petite taille rend les manipulations compliquées : pincer la queue manuellement ou à l'aide de pinces atraumatiques semble un bon moyen de vérifier si la profondeur anesthésique est adéquate pour une chirurgie (Flecknell, 2016). Au besoin, on peut augmenter le pourcentage des gaz anesthésiques, augmenter l'analgésie et /ou l'anesthésie par des bolus répétées ou la pose d'une CRI.

Pour Conclure sur le monitoring de l'anesthésie de la souris :

De nombreux paramètres peuvent être suivis pendant une anesthésie que ce soit cliniquement ou bien par l'assistance d'équipements spécifiques. Classiquement, les réflexes et la fonction respiratoire sont évaluées. Dans tous les cas, il faut connaître les normes des paramètres surveillés afin de savoir quand et comment réagir en cas d'anomalies. Le matériel de monitoring adapté aux rongeurs est onéreux. Comme évoqué, les implants télémétriques peuvent être une bonne solution lorsque plusieurs paramètres doivent être suivis sur le long terme afin de respecter le bien-être animal.

Seconde Partie : Etude expérimentale

I- Contexte et objectifs

A. Contexte de l'étude (Bouchaud)

Cette thèse s'inscrit dans un projet de recherche de nouvelles thérapeutiques de l'asthme allergique sévère chez l'Homme induisant une inflammation pulmonaire et un remodelage de l'arbre bronchique. Les corticoïdes demeurent le traitement classique mais peuvent induire des effets secondaires. Les patients peuvent présenter à terme une insuffisance respiratoire chronique.

Des analyses histologiques et de lavage broncho-alvéolaire de patients atteints ont montré l'implication de nombreuses cellules inflammatoires (lymphocytes Th2, lymphocytes B sécréteurs d'immunoglobulines E, cellules Natural Killer, éosinophiles, mastocytes, neutrophiles), de molécules pro-inflammatoires (histamine, leucotriènes) et d'interleukines (4, 5, 13) et facteurs de transcription qui influent sur l'amplification et l'entretien de la réponse inflammatoire et les modifications histologiques de la muqueuse broncho-alvéolaire (Hachem, 2006).

Aucun modèle non vivant n'est à ce jour pertinent pour modéliser cette pathologie. Ce projet utilise le modèle souris de souche Balb/c intéressante pour son orientation immunologique de type *Th2* déjà décrite. Les souris sont des femelles adultes âgées de 6 semaines au début du projet.

L'induction de l'asthme allergique et ses remodelages tissulaires est réalisée par sensibilisation selon le protocole House Dust Mite (HDM). Ce mélange d'allergènes contient des acariens des espèces les plus communes *Dermatophagoides pteronyssinus* et *Dermatophagoides farinae* et leurs déjections (Madouri, 2014). Dans ce projet, seul l'allergène de *D. farinae* est utilisé dans la préparation. Voici le protocole de sensibilisation :

- 4 applications percutanées auriculaires du mélange HDM à 500 µg solubilisé dans 20 µlitres de diméthylsulfoxyde (DMSO), à une semaine d'intervalle (J0, J7, J14 et J21)
- 1 semaine de latence
- Puis 6 applications intra-nasales du mélange HDM à 250 µg solubilisé dans 40 µlitres de tampon phosphate salin (PBS) (J27-28-29 puis J35-36-37)

Toutes ces manipulations sont faites sous anesthésie générale avec de la kétamine à 50 mg/kg et de xylazine à 4mg/kg injectées par voie IP.

Les analyses reposent sur des mesures de capacité respiratoire via deux méthodes (explicitées dans la partie bibliographique) chez quatre groupes différents de souris : allergiques non traitées, allergiques traitées, non allergiques traitées et des non allergiques non traitées :

- pléthysmographie sur souris vigile afin de suivre la mise en place de l'hyperréactivité bronchique.
- une étude classée sans réveil sur souris anesthésiée trachéotomisée : l'usage du Flexivent®.

Les deux traitements testés sont :

- soit des modulateurs de l'activité cytokinique complexés à un anticorps administrés par voie IP
- soit des peptides hypoallergéniques issus de *D. pteronyssinus* administrés par les voies SC, PO ou intranasale.

Les animaux reçoivent une dose par jour de J30 à J34 sous anesthésie, la même que celle utilisée pour les instillations d'HDM.

B. Objectifs de cette étude

Ce projet a pour but de trouver un protocole anesthésique adapté à la réalisation d'instillations nasales sur des souris Balb/c adultes femelles dans le cadre de travaux sur l'asthme. Les souris doivent dormir suffisamment afin de réaliser les instillations nasales de l'étude détaillée ci-dessus mais se réveiller rapidement après l'acte pour retrouver un comportement normal ; c'est-à-dire se nourrir, s'hydrater et se mouvoir. Les manipulateurs constatent que les souris s'endorment rapidement et profondément en moins de 5 minutes avec le protocole kétamine/xylazine aux doses détaillées ci-dessus ; une détresse respiratoire perdure une quinzaine de minutes post instillation nasale puis la souris retrouve une activité normale environ 1 heure 30 min après.

L'anesthésie gazeuse est écartée car elle peut influencer les paramètres pulmonaires (résistance, élastance) ; le sévoflurane réduit également les cellules et molécules pro-inflammatoires de l'arbre bronchique lors d'asthme (Burburan *et al.*, 2014).

Pour ce faire, nous avons d'abord recenser les diverses combinaisons anesthésiques fixes et leurs effets ainsi que les paramètres de monitoring couramment utilisés chez la souris de laboratoire. Le protocole adapté doit être de courte durée ; associé à un réveil rapide des animaux et sans complication. L'anesthésie chirurgicale n'est pas nécessaire car l'instillation nasale n'est pas réputée douloureuse.

Dans le cadre de cette thèse, nous voulons également élargir les connaissances sur l'influence d'un protocole anesthésique sur les réactions per-anesthésiques des souris en fonction de leur souche, leur âge et leur sexe.

Nous avons donc suivi les anesthésies induites par trois protocoles anesthésiques différents et travaillé avec trois souches de souris adultes mâles et femelles et observé leur comportement en début de réveil.

II- Matériels et méthodes

A. Animaux

1. Choix des animaux

Notre étude est réalisée *in vivo* car elle porte sur les effets de protocoles anesthésiques. Le modèle souris se justifie car l'étude sur l'asthme emploie cette espèce. Trois souches de souris sont utilisées :

- la Balb/c : cette souche est utilisée dans le projet initiant notre étude anesthésique, c'est la souche de référence.
- La C57Bl/6J, qui peut également être utilisée pour ce type d'étude (Gueders *et al.*, 2009). La connaissance du fond génétique de cette souche fait qu'elle est largement introduite dans les procédures expérimentales.
- La SWISS, souris polyvalente en recherche.

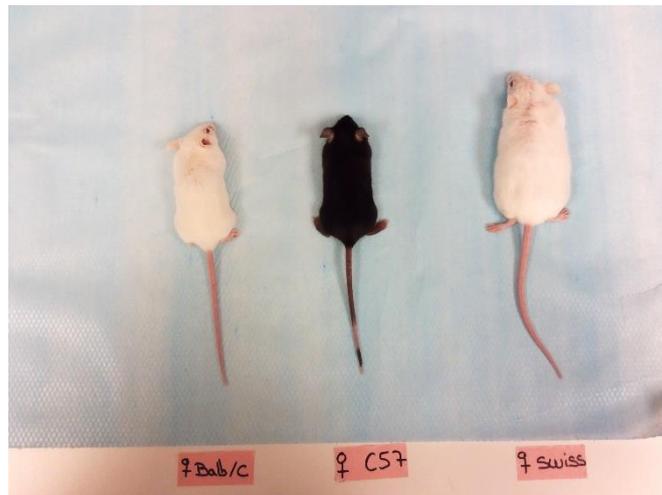


Figure 23 : Photographie des 3 souris femelle à 13 semaines d'âge en vue dorsale de chaque souche de l'étude

Les souris sont âgées de 6 à 10 semaines, donc adultes. Ce stade de vie est intéressant car les animaux sont jeunes, en pleine santé ; c'est également la tranche d'âge de l'étude sur l'asthme. Les deux sexes sont étudiés pour rentrer dans l'objectif de comparaison explicité précédemment.

En fin d'étude, les souris ne sont pas euthanasiées ni ré-incluses dans un autre projet mais seront proposées à l'adoption.

Concernant la traçabilité des rongeurs, chaque souris est inscrite dans le registre des entrées et sorties de l'animalerie à son arrivée ; chaque cage est associée à une étiquette comportant les données suivantes:

- Unité concernée et la personne en charge du projet
- Souche des souris
- Nombre de souris : cette donnée est mise à jour en cas de décès (euthanasie ou mort naturelle)
- Sexe
- Date de naissance
- Laboratoire d'origine
- Date d'arrivée à l'animalerie
- Numéros des souris
- Numéro du projet APAFIS
- Date de début du protocole

En cas de décès ou d'euthanasie jugée nécessaire (voir annexe 3), les cadavres sont emballés dans un sac plastique puis évacués vers une société d'équarrissage 'L'ambulance animalière'.

2. Détails des lots

Nous souhaitons suivre le concept de restriction des 3R et donc ne pas utiliser beaucoup d'animaux. C'est pourquoi nous avons d'abord réalisé une étude pilote sur un premier groupe de souris afin de tester nos protocoles anesthésiques et notre monitoring pour l'adapter si besoin dans l'étude principale qui s'est ensuite déroulée sur 1 mois avec un autre groupe de souris réutilisées plusieurs fois. Les deux études, pilote et principale, n'incluent donc pas les mêmes animaux.

Etude pilote :

Lors de la réception des souris, une souris mâle de souche C57Bl/6J était supplémentaire : elle a été intégrée à l'étude pilote. Cette étude a pour but de visualiser la réaction des animaux et les durées des anesthésies des différents protocoles ; de vérifier la réalisation du suivi anesthésique avec la fiche déjà décrite et le temps voué aux manipulations.

Les souris sont donc réparties afin d'inclure chaque souche dans chaque protocole. Plus de souris sont allouées au protocole propofol/ fentanyl car la littérature contient moins d'étude. Les souris sont anesthésiées une seule fois à l'âge de 6 semaines avec les protocoles détaillés ci-dessous.

Tableau XV : Répartition des 13 souris de 6 semaines pour l'étude pilote (KX : Kétamine + xylazine, PF : Propofol + fentanyl, KMA : Kétamine + xylazine + atipamézole)

Protocole	SWISS		Balb/c		C57Bl/6J	
	mâle	femelle	mâle	femelle	mâle	femelle
KX		1		1	1	1
PF	1	1	1	1	1	1
KMA	1		1		1	
Total	2	2	2	2	3	2

Etude principale :

Aucune étude statistique n'a été préalablement établie pour connaître le nombre de sujets à considérer dans chaque lot : la volonté d'un faible usage d'animaux et l'optimisation de la capacité d'accueil des cages sont pris en compte. De plus, de nombreux articles ont fait des études sur petits groupes de souris allant de 4 à 7 individus (Jaber, 2014 ; Alves, 2009 ; Buitrago, 2008). Chaque lot se compose de 5 souris et est utilisé neuf fois en totalité : une fois pour chaque protocole d'anesthésie à trois âges différents soit 7, 9 et 10 semaines.

Tableau XVI : Détail des lots de souris l'étude principale

Souche de souris	Femelle	Mâle
SWISS	5	5
Balb/c	5	5
C57Bl/6J	5	5

Pour chaque lot de souris, un marquage externe sur la queue à l'aide d'un marqueur hypoallergénique non indélébile pour enfant permet leur identification. Les traits étaient refaits 1 fois par semaine pour éviter un effacement total.

3. Provenance et hébergement

Les souris proviennent de chez Janvier Labs. L'entrée au sein des animaleries se fait par le passage du Pass Trough Cabinet 4 (PT4), sas de type PSM nettoyé avec un ammonium quaternaire de surface (Franklab®). Une période d'acclimatation de 5 jours est réalisée.

Les souris sont logées sur portoir ventilé (Allentown®), dans des cages en polysulfone de surface de 500 cm² et 12 cm de hauteur, matière résistante à l'autoclavage avec couvercle. La litière est faite de copeaux de peuplier (Serlab®). Les souris sont donc regroupées selon leur sexe et leur souche soit 5 individus par cage pour

l'étude principale et 2 individus par cage pour l'étude pilote. Un enrichissement constitué de frisottis en carton, d'une cachette en plastique rouge et un morceau de bois à ronger est identique pour toutes les cages. Le cycle jour/nuit est réalisé toutes les 12 heures (7h30 -19h30). La température des salles d'hébergement est comprise entre 19 et 24 °C ; l'hygrométrie varie de 30 à 60 %.

La nourriture est distribuée à volonté sous forme de granulés de type SAFE A04® irradiés à 10 kGy ; l'extérieur des sacs est systématiquement vaporisé de peroxyde d'hydrogène avant d'entrer dans l'animalerie. L'eau, filtrée par un système à 3 cartouches (AVIDITY®) de 5,1 puis 0,2 microns, elle est en accès libre et distribuée par biberon.

Le change des cages, des litières et des biberons est effectué tous les 10 jours sous hotte de change (Allentown®) ; la grille de distribution d'aliment et le couvercle de la cage est changé une fois tous les deux mois. L'eau et la nourriture sont vérifiées tous les jours. Les litières usagées sont prises en charge par Nantes Métropole. Les cages et les biberons sont nettoyées dans une machine de lavage Tecniplast® ; les tétines des biberons sont nettoyées et autoclavées (Getinge®).

B. Organisation des anesthésies

a) Protocoles et posologies retenus et technique d'administration

Trois protocoles anesthésiques sont testés : les posologies sont adaptées selon des données de la littérature. Une période de wash-out de deux jours au minimum est choisie afin de permettre aux souris d'éliminer les anesthésiques précédemment administrés et donc éviter toute interaction avec l'anesthésie précédente.

Protocole 1 : kétamine/xylazine (KX) (Jaber *et al.*, 2014)

Le protocole témoin est celui du projet sur l'asthme : la posologie est un peu différente car dans la littérature, les posologies sont plus élevées.

Protocole 2 : kétamine/ médétomidine/ atipamézole (KMA) (Cruz *et al.*, 1998)

L'intérêt de ce protocole est l'usage de l'atipamézole pour raccourcir l'anesthésie. Nous choisissons de l'injecter 20 minutes post induction par voie IP.

Protocole 3 : propofol/ fentanyl (PF) (Alves *et al.*, 2007)

Ces deux molécules confèrent une anesthésie de l'ordre de 15 minutes.

Tableau XVII : Spécialités vétérinaires utilisés et détails des posologies retenues des différents protocoles anesthésiques (RCP des spécialités)

Protocole	Molécule	Posologie (mg/kg)	Nom Spécialité Vétérinaire Concentration (mg/mL)	Volume pour 10 grammes de souris (µL)
KX	Kétamine	80	KETAMINE 1000 100	8
	Xylazine	8	ROMPUN 2% 20	4
	Sérum physiologique	/	RINGER LACTATE /	128
KMA	Kétamine	75	KETAMINE 1000 100	7,5
	Médétomidine	1	DOMITOR 0.85	11,8
	Sérum physiologique	/	RINGER LACTATE /	120,7
Antidote	Atipamézole	0,5	ANTISEDAN 4.28	1,17

PF	Propofol	100	PROPOVET 10	100
	Fentanyl	0,2	FENTADON 50 µg/mL	40

On repère rapidement que selon le protocole, les volumes à injecter diffèrent selon les molécules. L'emploi de sérum physiologique est justifié afin d'égaliser à un volume de 140 µl de solution injectable pour 10 grammes de souris et de diminuer le risque d'erreur de surdosage. Pour une journée d'étude, les 30 souris sont anesthésiées avec le même protocole : la solution anesthésique est préparée le matin et conservée au réfrigérateur dans un tube Eppendorf entre les anesthésies des trois souches puis jetées en fin de session. Les anesthésiques sont jetés avec les Déchets d'Activités de Soins à Risque Infectieux (DASRI).

Toutes les molécules anesthésiques utilisées sont disponibles en solutions injectables dans des spécialités vétérinaires mais leur utilisation est hors AMM excepté pour l'IMALGENE NDV qui est indiquée pour les animaux de laboratoire. Le FENTADON NDV et l'IMALGENE NDV sont détenus et utilisés en respectant la législation allouée aux stupéfiants. Toutes les autres spécialités sont conservées au réfrigérateur après ouverture. Concernant le PROPOVET NDV, un nouveau flacon est ouvert à chaque anesthésie PF ; sa présentation en émulsion injectable peut faciliter le développement de micro-organismes après 6 heures d'ouverture (Fish et al, 2009).

La pesée des souris en début de journée permet de connaître le volume total d'anesthésiques à préparer. Les seringues sont remplies avant de débuter l'anesthésie d'une même souche. Tous les anesthésiques sont administrés par voie IP dans le cadran abdominal droit à l'aide d'une seringue de 1 ml (TERUMO®) et des aiguilles de 26 gauge (BD Microlance®) par le même manipulateur Marie-Aude Cheminant : technicienne de laboratoire. Les seringues sont jetées dans la poubelle des déchets ménagers tandis que les aiguilles vont avec les coupants/tranchants.



Figure 24 : Illustration de la contention de la souris et de l'injection intra-péritonéale sur une souris Balb/c mâle

b) Etablissement du planning

Pour éviter une possible influence du rythme circadien des rongeurs sur les anesthésies, une rotation des souches de souris est effectuée . Cependant, l'ordre des souris d'une même souche permis par le marquage individuel déjà décrit, est toujours identique : les 5 mâles puis les 5 femelles. Toutes les souris reçoivent le même protocole anesthésique un même jour donné.

Tableau XVIII: Planning des anesthésies et ordre de passage des groupes (Définitions des groupes : Groupe A : 10 souris Balb/c ; Groupe B : 10 souris C57Bl/6J ; Groupe C : 10 souris SWISS)

Age : 7 semaines			Age : 9 semaines			Age : 10 semaines		
J0	J2	J4	J14	J16	J18	J21	J23	J25
KX	PF	KMA	PF	KMA	KX	KMA	KX	PF
A	B	C	A	B	C	A	B	C
B	C	A	B	C	A	B	C	A
C	A	B	C	A	B	C	A	B

Chaque souris reçoit donc trois injections IP par semaine d'étude.

C. Coût des animaux et des anesthésiques

Le réel investissement de cette étude se compose des animaux et des produits anesthésiques car tout autre matériel était déjà présent dans l'animalerie.

Tableau XIX : Frais d'achat des souris provenant de Janvier Labs (Inserm, 2019)

Souche	C57Bl/6J	Balb/c	Swiss
Prix unitaire (euros)	11,16	10,65	3,78
Prix pour 7 animaux (euros)	78,12	74,55	26,46
Frais de transport (euros)	15,91		
Total frais animaux	374,1 €		

Tableau XX : Spécialités vétérinaires des anesthésiques utilisés et coût associé

Nom de la Spécialité vétérinaire	Contenance du flacon (ml)	Prix du flacon hors taxe (euros)	Prix pour 1ml de solution hors taxe (euros)
KETAMINE 1000	10	9,48	0,94
ROMPUN 2%	25	46,56	1,86
DOMITOR	10	67,27	6,73
ANTISEDAN	10	79,09	7,90
PROPOVET	20	13	0,65
FENTADON	10	17,85	1,79

Tableau XXI : Coût de l'anesthésie pour une souris pour chaque protocole (le sérum physiologique n'est pas inclus)

Protocole anesthésique	KX	PF	KMA
Coût pour 1 souris de 25 grammes (euros)	0,054	0,342	0,060

Le coût du protocole propofol/fentanyl est 5 fois plus élevé que ceux utilisant la kétamine et les alpha2-agonistes.

D. Suivi per- et post-anesthésique

Selon le classement ASA, nos souris étant adultes et en bonne santé, elles sont ASA I. Aucune mise à jeun n'est réalisée avant l'anesthésie.

1. Monitorer l'anesthésie : création d'une fiche de suivi de l'anesthésie

Lors d'une séquence anesthésique, les dix souris d'une même souche sont endormies : les mâles puis les femelles. L'opération est répétée trois fois dans une même journée (3 souches).

Les dix souris sont placées dans des petites cages individuelles afin qu'elles explorent leur nouvel environnement quelques minutes avant le début de l'anesthésie. Un signal sonore avertit la technicienne pour induire les 10 souris d'une même souche à 1 minute d'intervalle. Chaque souris est remise dans sa cage jusqu'à la perte du « righting reflex » détaillé précédemment puis elle est placée en décubitus dorsal sur le tapis chauffant devant sa cage.



Figure 25: Disposition des 5 souris d'un sexe donné et d'une souche donnée anesthésiées sur tapis chauffant en décubitus dorsal, chacune associée à une petite cage de logement avant et après l'anesthésie

L'évaluation de la profondeur anesthésique est réalisée sur 1 heure et 30 minutes, une fiche individuelle est remplie au fur et à mesure. Deux manipulatrices évaluent chaque souris toutes les 5 minutes, successivement. Chaque évaluation dure 1 minute par individu ; un signal sonore indique à quel moment il faut changer d'individu.

Deux temps phares de l'anesthésie de chaque individu sont relevés :

- T_0 : temps défini par la perte du « righting reflex »
- T_{fin} : associé à la perte du décubitus et reprise de la position sur 4 pattes

Contrôle de la température corporelle à l'aide d'un tapis chauffant

Les cinq souris du même sexe sont placées sur le même tapis chauffant délivrant une température constante non modulable durant toute l'anesthésie. Ce tapis est initialement prévu pour les terrariums.

Fréquence respiratoire

La fréquence respiratoire est évaluée visuellement par les mouvements thoraciques pendant 10 secondes à l'aide d'un chronomètre qui délimite la séquence de comptage.

Réflexes et sensibilités

Tous les réflexes sont testés avec une pince hémostatique Mosquito de Halsted sur les souris anesthésiées placées en décubitus dorsal. Le but est de vérifier qu'aucun mouvement ou vocalise n'y fait suite.

- le « réflexe cutané » consiste à effleurer l'abdomen dans le sens cranio-caudal avec le clamp chirurgical maintenu fermé.
- le « réflexe podal » : l'extrémité de la patte est pincée au niveau des doigts. Les deux membres sont alternés afin de ne pas induire de lésions suite aux pincements répétés malgré l'usage de pinces atraumatiques d'où les lettres 'D' pour droit et 'G' pour gauche indiquant quel membre pelvien stimuler.
- le « réflexe de la queue » consiste également à pincer la queue dans son tiers distal.

L'intensité de la réponse est évaluée sur une échelle croissante de 0 (absent) à 3 (réponse majeure).



Figure 26: Illustration de réalisation des 3 réflexes cutané, podal et caudal de gauche à droite sur une souris C57Bl/6J femelle

Observations comportementales qualitatives

Cette partie de la fiche a été ajoutée suite à l'étude pilote : toutes les observations comportementales remarquées ont été suggérées.

Un contrôle visuel repère tout mouvement d'une partie du corps, un changement de décubitus ou un déplacement en fin d'anesthésie. Tous les paramètres qualitatifs sont soit présents (noté +) soit absents.

En fin d'anesthésie, la souris est remise dans sa cage afin d'observer sa qualité de réveil. Si elle est suffisamment mobile, elle est replacée dans sa cage d'hébergement.

2. Suivi entre les anesthésies

Comportement post-anesthésiques

La phase de réveil est décrite qualitativement en fonction de la capacité à se déplacer rapidement après perte du décubitus latéral, avec ou sans stimulus. La courbe respiratoire est aussi appréciée visuellement.

Examen visuel

Toute manipulation des souris permet de vérifier leur vitalité bon état général extérieur : absence de griffure, morsure, alopecie, hématome. Il ne faut pas oublier que la souche et le sexe influent sur le comportement des individus. Un ensemble de signes cliniques est fourni en annexe de la saisine pour attester que le bien-être des souris est pris en compte durant tout le projet et non uniquement au cours des anesthésies (voir annexe 2).

Courbes de poids

Les souris sont pesées chaque jour de manipulation. Le poids est un paramètre permettant de suivre l'impact des manipulations sur son bien-être : Une perte de 10% du poids chez la souris révèle une souffrance physique et une perte de 15-20% est motif d'euthanasie.

E. Obligation réglementaire : Rédaction de la demande d'autorisation de projet (voir annexe 1)

Comme pour tout projet scientifique utilisant des animaux vivants, nous avons rempli une « DEMANDE D'AUTORISATION DE PROJET UTILISANT DES ANIMAUX A DES FINS SCIENTIFIQUES » ; une trame du formulaire est disponible à l'adresse autorisation-projet@recherche.gouv.fr. Dans notre projet, nous avons deux procédures expérimentales distinctes à détailler (études pilote et principale). Un tableau des signes cliniques signant une atteinte sévère et justifiant une euthanasie a également été transmis (voir annexe 2). Le formulaire rempli a été déposé sur la plateforme APAFIS du MESRI.

Suite à l'évaluation par le comité d'éthique, un premier avis (voir annexe 3) nous a été envoyé pour que certaines notions soient rajoutées dans le formulaire. Aucune évaluation rétrospective n'est demandée. Le 26 juin 2019, le projet est validé réglementairement par le MESRI (voir annexe 4).

F. Traitements des données statistiques

Un modèle à effets mixtes est un modèle hiérarchique dans lequel le premier niveau modélise la réponse individuelle, le deuxième niveau modélise le comportement des paramètres pour l'ensemble de la population. Par exemple pour l'étude de l'effet du temps, de la souche (Souche) et du protocole d'anesthésie (Anesthésie) sur la fréquence respiratoire (FR) le modèle s'écrit :

Niveau individuel :

$$FR_{ijk} = \alpha_i + \beta_{1i} * temps_{ij} + \beta_{2i} * Souche_{ik} * Anesthésie_{il} + \varepsilon_{ijkl}$$

$$\text{Niveau population : } \begin{cases} \alpha_i = \alpha + a_i \\ \beta_{1i} = \beta_1 + b_{1i} \\ \beta_{2i} = \beta_2 + b_{2i} \end{cases}$$

ε_{ijk} sont les résidus, ils doivent être indépendamment et identiquement distribués selon une loi $N(0, \sigma^2)$ ou σ^2 est la variance résiduelle du modèle

Les coefficients α , β_1 , β_2 sont appelés effets fixes, ils sont les estimations ponctuelles des paramètres pour l'ensemble de la population

Les coefficients a_i , b_{1i} , b_{2i} sont les effets aléatoires, ils doivent être distribués selon une loi normale

La normalité des résidus et des effets aléatoires ont été vérifiées et validées pour chaque modèle au moyens de graphiques préconisés par les auteurs des modèles à effets mixtes (JC Pinheiro and M D Bates, 2000).

III- Résultats

A. Apport de l'étude pilote

1. Données qualitatives sur l'influence de chaque protocole

Avec le protocole témoin (KX), la durée d'anesthésie est plus longue pour la souche C57Bl/6J. Pour toutes les souches, la présence permanente des réflexes semble révéler une anesthésie non chirurgicale. Enfin la capacité de déplacement revient rapidement après la fin de l'anesthésie.

Tableau XXII : Durée des anesthésies avec le protocole kétamine/ xylazine sur les 4 souris

Souche	SWISS	Balb/c	C57Bl/6J	
Durée anesthésie (minutes)	38	40	59	65

Le protocole PF ne semble pas permettre de chirurgie non plus. Des disparités entre les souches sont notables :

- Les 2 souris Balb/c n'ont même pas dormi pendant 5 minutes, aucun réflexe n'a pu être évalué
- Les 2 souris SWISS ont dormi respectivement 5 et 19 minutes ; elles sont capables de se déplacer vite après le réveil
- Les 2 souris C57Bl/6J en revanche ont dormi 54 et 41 minutes ; elles ont des difficultés à retrouver un comportement normal rapidement après la fin de l'anesthésie. Au cours de l'anesthésie, elles présentent une respiration saccadée avec des apnées fréquentes ; des vocalises, des spasmes voire une position d'ospithotonos.

Le protocole KMA ne permet pas non plus de temps chirurgical. Jusqu'à l'injection d'atipamézole, les 3 souris dorment correctement. L'atipamézole provoque en moins de 5 minutes une augmentation de la fréquence respiratoire de l'ordre de 10 à 30% qui devient compliquée à évaluer manuellement ; les souris présentent également un stress dans leur sommeil.

L'étude pilote nous apporte quelques informations sur les anesthésies et leur suivi. La fréquence respiratoire est tout à fait évaluable manuellement sur 10 secondes excepté après l'administration d'atipamézole. L'augmentation de la fréquence respiratoire diminue l'amplitude des mouvements respiratoires, leur visualisation et le décompte sont plus difficiles et donc surement plus approximatifs. Les tests des réflexes sont facilement réalisables ; l'effleurage cutané présent indique souvent un réveil proche. Un grand nombre de signes qualitatifs ont été repérés : la fiche doit être plus précise pour réduire le temps d'écriture et augmenter le temps de surveillance des souris endormies.

Les protocoles PF et KX sont normaux. Cependant, pour le dernier protocole KMA, la réversion à l'atipamézole entraîne des signes cliniques mortels. La dose voire la voie d'injection doivent être revues.

Tableau XXI: Signes cliniques des 3 souris suite à l'injection d'atipamézole à 5 mg/kg en IP 20 minutes après l'administration du mélange kétamine/ médétomidine.

Souche	Signes	Moment du décès et cause
SWISS	Bouche ouverte Mouvements tête et vibrisses Augmentation fréquence respiratoire	24 minutes après atipamézole Euthanasie par élongation cervicale
Balb/c	Tachypnée Tirage costal Vocalises Mouvements tête et membres	Quelques heures post anesthésie

	Difficulté à se déplacer au réveil	
C57Bl/6J	Bouche ouverte Augmentation fréquence respiratoire Mouvements tête et membres thoraciques	20 minutes après atipamézole Arrêt cardio respiratoire

2. Modifications du protocole KMA de l'étude principale : posologie et voie d'administration

Suite à la perte des 3 souris de l'étude pilote, le protocole kétamine/ médétomidine/ atipamézole doit être modifié.

Pour rappel, Flecknell conseille d'injecter l'atipamézole au moins 30 voire 40 minutes après une administration de médétomidine associée à la kétamine. Au niveau de la posologie, il est compliqué d'avoir une valeur sûre. Avec l'usage de la médétomidine à 1 mg/kg, Flecknel et Cruz préconisent 1 mg/kg d'atipamézole ; Cruz indique même la possibilité de doubler la dose pour les souris femelles. La dose d'atipamézole est diminuée à 1 mg/kg et injectée 30 minutes après le début de l'anesthésie au lieu de 20.

Une étude sur une souris mâle de chaque souche est réalisée de nouveau quatre jours plus tard afin de vérifier si ces modifications conviennent. Ce sont des souris de l'étude pilote.

Les souris SWISS et Balb/c se réveillent dans les 10 minutes post injection de l'atipamézole. Un état d'excitation et de désorientation suite au réveil persiste pendant 30 à 40 minutes : les souris se déplacent en titubant, en chutant sur le côté.

La souris C57Bl/6J s'est réveillée 20 minutes post injection de l'atipamézole en vocalisant sans interruption et avec des difficultés respiratoires. Le choix d'une euthanasie par élongation cervicale est pris au vu de ses signes pouvant évoquer une souffrance.

Suite à la perte d'une souris sur trois, la posologie de l'atipamézole est diminuée à 0,5 mg/kg. L'injection sera effectuée 30 minutes après l'induction anesthésique par voie sous-cutanée avec une seringue à insuline TERUMO® au vu des volumes minimales.

Ce protocole a été testé sur trois souris femelles de l'étude pilote : l'augmentation de fréquence respiratoire post atipamézole est évaluable et moins tranchée en comparaison des protocoles précédents. Toutes les souris se sont réveillées correctement sans anomalie majeure.

3. Modification de la fiche de suivi d'anesthésie (voir matériel et méthodes)

La fiche de suivi est revue ; les caractères qualitatifs visualisés au cours de l'étude pilote sont notés directement sur la fiche de suivi afin de raccourcir le temps d'écriture lors des manipulations. Un '+' indiquera la présence de l'un de ces signes au cours d'une évaluation anesthésique.

La coloration de la case '30 min' rappelle au manipulateur à quel moment l'atipamézole doit être injecté.

B. Influence de l'âge

Lors du traitement des données statistiques, la comparaison des données pour les 3 âges distincts n'a pas été réalisée par choix. En effet, suite au décès de certains individus, la taille des échantillons s'est trouvée fortement réduite et déséquilibrée selon les souches. Il a été jugé préférable de se focaliser sur les souris de 7 semaines uniquement afin de ne pas biaiser les résultats.

C. Influence du sexe

Les statistiques descriptives des paramètres quantitatifs ont été réalisées sur de petits échantillons soit 5 individus pour dissocier les mâles et femelles de chaque souche.

1. Sur la fréquence respiratoire

La fonction intervals du logiciel R n'a pas permis de montrer que le sexe avait un effet sur la fréquence respiratoire car les intervalles de confiance se chevauchent.

2. Sur le temps d'induction anesthésique

Toutes les souches ne réagissent pas de la même façon lors de l'injection de l'anesthésique de manière significativement différente (Pvalue < 0,001).

Tableau XXIII : Récapitulatif des intervalles de confiance et de la moyenne du temps d'induction (en secondes) entre les mâles et femelles des différentes souches selon les 3 protocoles anesthésiques (source : R commander)

Echantillon	KX	KMA	PF
Femelles SWISS	111- 145 (128)	83,5- 94,1 (88,8)	135,2- 180,6 (157,8)
Femelles C57	99,4 – 119,6 (109,5)	60,3- 111,5 (85,9)	154,8- 205,2 (180)
Femelles Balb	170,2- 205,6 (187,9)	105,6- 136,8 (121,2)	127,8- 204,2 (166)
Mâles SWISS	141- 182,4 (161,7)	73,2- 92,8 (82,9)	93,8- 165,8 (129,8)
Mâles C57	92,2- 134,6 (113,4)	97,2- 131,6 (114,4)	131,6- 172,8 (152,2)
Mâles Balb	90,3- 240,3 (165,3)	96,3- 108,3 (102,3)	69,1 – 215,1 (142,1)

Pour une souche donnée, tous les intervalles de confiance se chevauchent. Le facteur sexe semble à première vue ne pas influencer le temps d'induction anesthésique quel que soit le protocole anesthésique utilisé.

Tableau XXIV: Comparaison des moyennes des temps d'induction anesthésiques en secondes selon le sexe (source : Rcommander)

Souche	Mâle	Femelle	p-value
KX			
C57	113,4	109,5	0,1239
Balb	165,3	187,9	0,03528 < 0,05
SWISS	161,7	128	$7,9 \cdot 10^{-14} < 0,001$
KMA			
C57	114,4	85,9	$1,296 \cdot 10^{-7} < 0,001$
Balb	102,3	121,2	$5,803 \cdot 10^{-9} < 0,001$
SWISS	82,9	88,8	$1,059 \cdot 10^{-3} < 0,001$
PF			
C57	152,2	180	$2,54 \cdot 10^{-12} < 0,001$
Balb	142,1	166	0,448
SWISS	129,8	157,8	$2,599 \cdot 10^{-3} < 0,001$

Q

quelques différences ressortent tout de même :

- Pour le protocole KX : seules les femelles de la souche SWISS ont mis significativement moins de temps, soit 33,7 secondes de moins, à perdre le righting reflex en comparaison avec les mâles SWISS.

- Pour le protocole KMA : toutes les moyennes des temps d'induction sont significativement différentes ; les femelles C57 ont perdu le righting reflex 28 secondes après les mâles C57. Pour les souches Balb et SWISS, les mâles se sont endormis plus rapidement, soit 18,9 et 5,9 secondes respectivement.
- Pour le protocole PF : les mâles de chaque souche se sont endormis plus rapidement. La différence n'est pas significative pour la souche Balb. Les femelles de la souche C57 dorment en moyenne 27,8 secondes après les mâles C57 ; 28 secondes pour la souche SWISS.

Tableau XXV: Moyenne des temps d'induction de chaque sexe toute souche confondue selon les 3 protocoles anesthésiques.

Moyenne des temps d'induction d'anesthésie (secondes)	KX	KMA	PF
Femelles	141,8	98,6	167,9
Mâles	146,8	99,9	141,3

Le temps d'induction anesthésique est plus court avec le protocole KMA pour les 2 sexes. Le protocole PF semble permettre un temps d'induction beaucoup plus court de 26,6 secondes pour les mâles que pour les femelles toutes souche confondues.

3. Sur la durée d'anesthésie

Il faut noter que dans certains cas la durée totale de l'anesthésie n'a pas été relevé car la fin de relevés des paramètres était fixée à 1h30 post injection des molécules anesthésiques.

Tableau XXVI : Comparaison des moyennes des temps d'anesthésie selon le sexe et la souche en secondes (source : Rcommander)

Souche	Mâle	Femelle	Pvalue
KX			
C57	5168,8	4194,6	$2,2 \cdot 10^{-16} < 0,001$
Balb	2974,8	1919,2	$2,2 \cdot 10^{-16} < 0,001$
SWISS	2422,8	2868,9	$2,312 \cdot 10^{-7} < 0,001$
KMA			
C57	2702,9	2666,7	0,7696
Balb	2269,6	2364,2	$0,0343 < 0,05$
SWISS	2441,2	3636,7	$2,2 \cdot 10^{-16} < 0,001$
PF			
C57	5498	4538	$4,108 \cdot 10^{-5} < 0,001$
Balb	461,1	777,2	0,1111
SWISS	1122,3	2440	$1,542 \cdot 10^{-8} < 0,001$

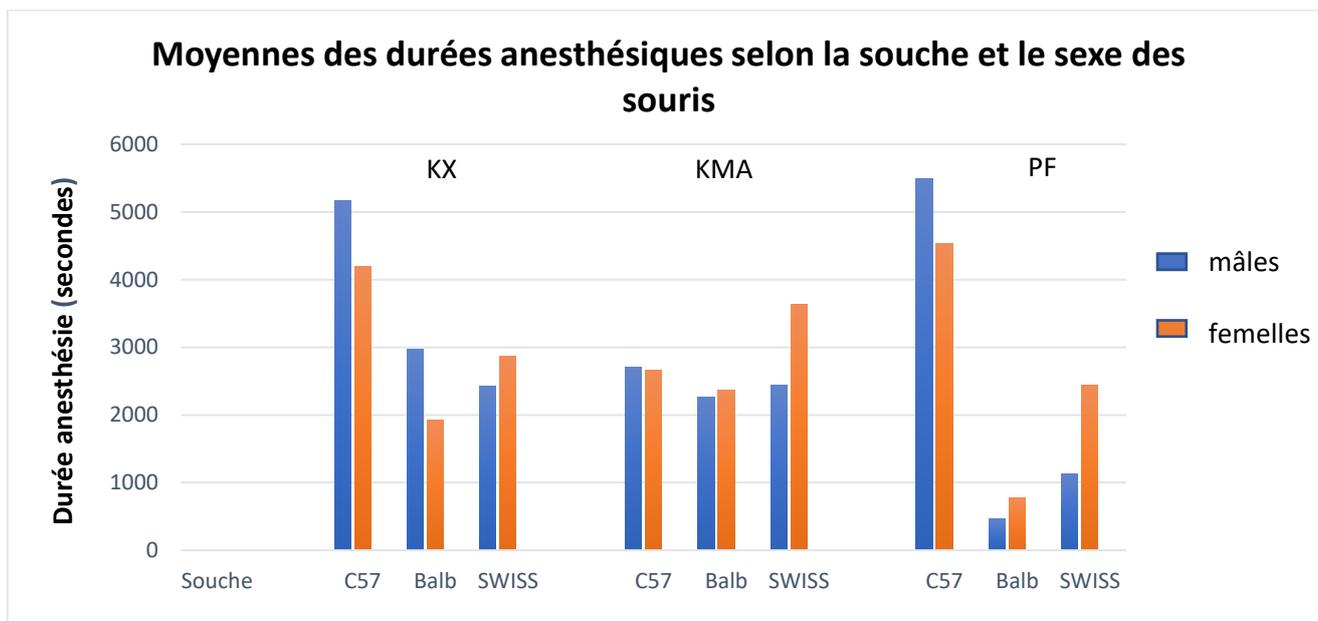


Figure 28: Graphique illustrant la durée des 3 anesthésies selon la souche et le sexe (en bleu les mâles et en orange les femelles)

Des différences sont notables selon le sexe :

- Pour le protocole KX : les femelles des souches Balb et C57 ont dormi moins longtemps que les mâles de même souche avec un écart pratiquement identique de 1000 secondes soit de 16 minutes. Concernant la souche SWISS, les mâles ont dormi 446,1 secondes moins longtemps que les femelles.
- Pour le protocole KMA : seule la souche SWISS présente des valeurs moyennes significativement différentes. Les mâles ont dormi 1195,5 secondes soit 20 minutes moins longtemps que les femelles.
- Pour le protocole PF : la durée anesthésique est plus courte pour les femelles C57 de 16 minutes que les mâles C57. En revanche, pour la souche SWISS, les femelles ont dormi 2 fois plus longtemps que les mâles (environ 22 minutes). La Pvalue de la souche Balb/c n'indique pas une différence significative.

Pour Conclure :

Pour une souche donnée, le sexe a un effet sur le temps d'induction anesthésique et sur sa durée. Seule la souche Balb/c affectée au protocole PF déroge à la règle : aucune différence significative n'est présente pour ces deux paramètres. Enfin le sexe n'affecte pas la fréquence respiratoire au cours d'une anesthésie.

D. Interactions du protocole anesthésique et de la souche

1. Sur la fréquence respiratoire

Toutes les souches ne réagissent significativement pas de la même façon selon le protocole anesthésique

à tout temps confondu concernant leur fréquence respiratoire (Pvalue < 0,001).

Le facteur 'temps' influence principalement la fréquence respiratoire. En effet, on constate une stabilisation assez rapide après injection de l'anesthésique ; la fréquence respiratoire réaugmente légèrement avant la phase de réveil.

a) Cas particulier de la souche C57 sous protocole PF

La souche ne semble pas réellement influencer sur la fréquence respiratoire mais plutôt sur le rythme respiratoire. En effet, chaque souche a une fréquence respiratoire moyenne de même ordre de grandeur quel que soit le protocole anesthésique. Cependant, la souche C57 présente une fréquence respiratoire plus basse que les deux autres souches ainsi que des apnées respiratoires fréquentes avec le protocole PF uniquement. Une souris a présenté une discordance et une autre a respiré temporairement par la bouche plutôt que par les narines. Certains individus ont une fréquence respiratoire de 25 mvts/min lors du relevé ce qui est très faible.

b) Particularités du protocole KMA

Concernant le protocole KMA, le graphique de la figure 28 permet de visualiser l'impact de l'injection d'atipamézole trente minutes après le début de l'anesthésie. Les moyennes des fréquences respiratoires des 6 groupes sont calculées entre le début de l'anesthésie et 10 minutes après l'injection d'atipamézole : certaines souris étant réveillées après cette période, les fréquences respiratoires ne sont plus relevées.

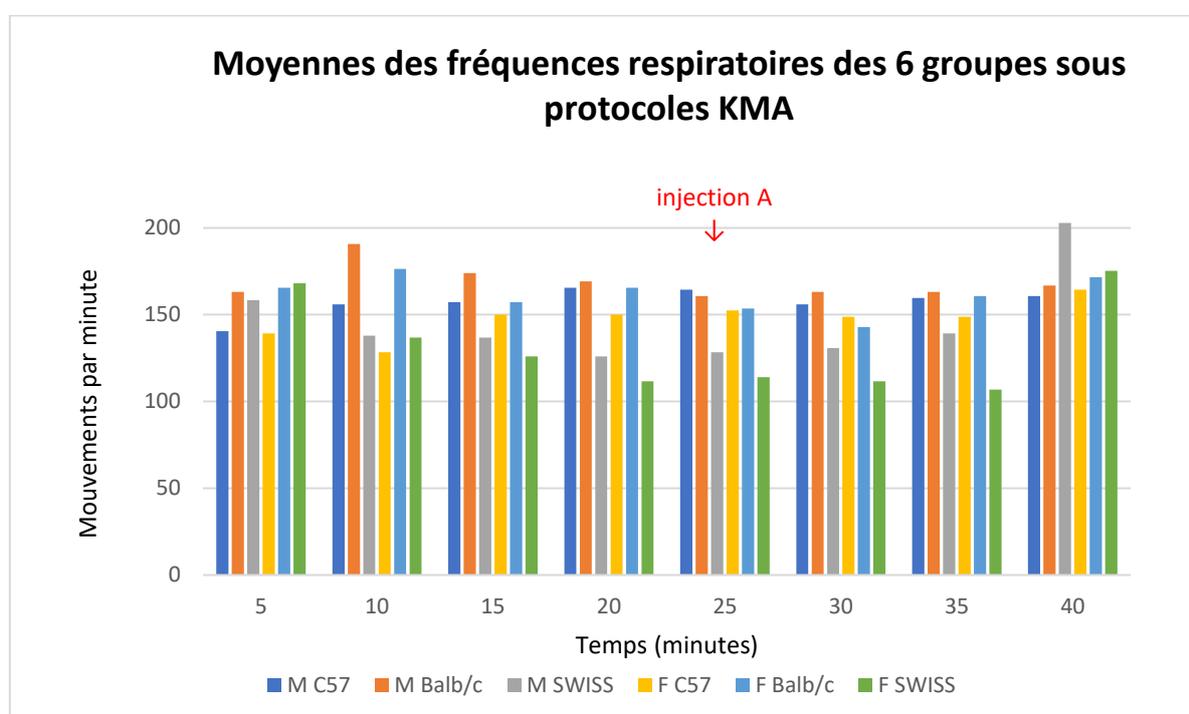


Figure 29: Graphique donnant les moyennes des fréquences respiratoires de chaque groupe avec le protocole KMA de To à 10 minutes après injection d'atipamézole

On ne constate pas de différence majeure de la fréquence respiratoire selon les souches, que ce soit avant ou après l'injection d'atipamézole excepté pour la souche SWISS. L'augmentation de la fréquence respiratoire à 5 et 10 minutes après administration d'atipamézole est d'environ 58% pour les femelles et de 46% pour les mâles.

Tableau XXVII: Fréquences respiratoires des six groupes sous protocole KMA avant injection d'atipamézole et 10 minutes après.

Fréquence respiratoire (mouvements / minute)						
Sexe/Souche	M C57	M Balb/c	M SWISS	F C57	F Balb/c	F SWISS
Avant A (t= 30 min)	156	163,2	130,8	148,8	142,8	111,6
Moyenne	150			134,4		

Après A (t= 40 min)	160,8	166,8	202,8	164,4	171,6	175,2
Moyenne	176,8			170,4		

2. Sur l'induction anesthésique

Le temps d'induction varie selon les deux facteurs souche et anesthésie de façon significative (Pvalue <0,001). Cependant, le facteur anesthésie seul joue un rôle prédominant (Pvalue <0,001) par rapport au facteur souche (Pvalue= 0,0241) pour les mâles uniquement. Des différences significatives du temps d'induction pour un même genre entre les souches sont présentes (voir tableau XXIII).

Pour les mâles, deux duos permettent d'obtenir un temps d'induction significativement différent (Pvalue<0,001) : il s'agit de SWISS/KMA et Balb/KX avec respectivement 82,9 et 161,7 secondes. Ils constituent d'ailleurs les deux extrêmes. Pour tout protocole confondu, il faut moins de 3 minutes pour endormir une souris mâle. Toutefois, le protocole KMA permet une induction plus rapide en moins 1 minute 40 en comparaison avec les deux autres protocoles.

Chez les femelles, tous les groupes présentent un temps d'induction significativement différent (Pvalue < 0,001) sauf les groupes Balb/KMA et SWISS/PF avec une Pvalue de 0,0012.

- les femelles Balb avec le protocole KX mettent 188 secondes pour s'endormir soit 1 minute de plus que les 2 autres souches.
- sous protocole KMA, les femelles Balb mettent 1,5 fois plus de temps que les deux autres souches à s'endormir.
- le protocole PF implique un temps d'induction plus long tandis que le protocole KMA permet une anesthésie en moins de 2 minutes.

Pour conclure :

Le seul facteur 'souche' n'influe pas sur le temps d'induction : aucun groupe ne se retrouve toujours avec un temps d'induction plus long ou plus court pour tous les protocoles anesthésiques.

L'association Balb/KX implique le plus grand temps d'induction, avoisinant les 3 minutes voire plus tout sexe confondu. Le protocole PF permet un temps d'induction assez homogène entre les souches. Enfin, le protocole KMA permet une induction de moins de 2 minutes pour toutes les souches.

3. Sur la durée anesthésique

Sachant que le facteur 'sexe' a une influence sur la durée de l'anesthésie, les analyses statistiques sont réalisées sur les mâles et femelles séparément.

Concernant les femelles, quatre associations souche/anesthésie ne sont pas significativement différentes pour la durée d'anesthésie : Balb/KMA ; C57/KMA ; SWISS/PF et SWISS/KX et tournent autour de 40 minutes. En reprenant les données du tableau XXVI, on peut affirmer :

- Avec le protocole KMA, la souche SWISS dort le plus longtemps, soit 1 heure, par rapport aux autres souches. Le protocole KMA est moins intéressant pour la souche SWISS si une anesthésie de courte durée est recherchée.
- Le protocole PF est intéressant pour la souche SWISS qui dort en moyenne 13 minutes. Les femelles SWISS dorment 40 minutes. La majorité des individus C57 dormaient encore à l'arrêt des relevés.
- Le protocole témoin KX permet une anesthésie de 32 minutes et significativement plus courte pour la souche Balb mais également significativement plus longue pour les C57 soit 1h10.

Concernant les mâles, le protocole KMA n'offre aucune différence de temps d'anesthésie quelle que soit la souche. La durée d'anesthésie pour l'association SWISS/PF n'est pas différente significativement (Pvalue =0,08).

En revanche sous PF, la souche Balb/c dort moins de 8 minutes tandis que la C57 dort plus de 1h30. Pour le protocole KX, les C57 dorment 2 fois plus longtemps que les Balb et les SWISS soit 1h20.

Pour conclure :

Dans le cadre de trouver une anesthésie de courte durée, on peut conserver le protocole KMA qui offre environ 40 minutes pour toutes les souches et ce quel que soit le sexe (excepté pour les femelles SWISS). En revanche, les protocoles KX et PF ne sont pas adaptés à la souche C57.

La souche SWISS semble bien tolérer le protocole PF car elle dort moins de 10 minutes.

Concernant le témoin KX, elle permet une durée d'anesthésie moyenne pour les souches SWISS et Balb/c.

4. Sur la profondeur anesthésique

Une analyse statistique descriptive est choisie au vu des résultats très diversifiés.

Les 3 réflexes testés (cutané, podal et pincement de la queue) pendant l'anesthésie sont difficilement interprétables. Toutefois, il ressort que :

- Le réflexe cutané nous apporte peu d'informations car il est souvent négatif. Sa présence indique cependant un réveil proche.
- Les réflexes podal et caudal sont plus ou moins présents au cours de l'anesthésie et peuvent varier en intensité.
- Une minorité d'animaux ont présenté une absence de ces 3 réflexes pour 2 relevés consécutifs.

Les vocalises et le clignement des yeux ont été peu aperçus pour chaque protocole anesthésique.

Quelques spasmes sont repérables lors de certains relevés. Leur fréquence est forte sous PF pour la souche C57 et sous KMA pour la souche Balb.

Les mouvements de la tête, des vibrisses, des pattes et de la queue sont variables selon les individus. Ils sont marqués pour la souche C57 sous PF ainsi que pour toutes les souches après injection d'atipamézole sous KMA révélant une phase de changements biologiques.

L'émission d'urines est présente pour une souris C57 sous PF ; 2 souris C57 sous KX. Sous KMA, 4 souris SWISS et 2 C57 ont uriné pendant l'anesthésie.

Une opacification blanchâtre de la cornée est observée sous KMA pour un grand nombre de souris malgré l'application de larmes artificielles. L'aspect de l'œil revient à la normale au réveil.

Une attention particulière aux souris C57 qui sous PF présentent des postures d'opisthotonos avec les quatre membres tendus ainsi que des spasmes et des grandes apnées respiratoires déjà mentionnées. Seule l'association C57/PF a permis d'observer ces réactions révélant une anesthésie non chirurgicale.

5. Comportement post anesthésie

Selon les protocoles utilisés, chaque souche ne réagissait pas de la même façon pendant la phase de réveil. La reprise du rythme de vie est obligatoire pour replacer les animaux dans de bonnes conditions.

On a mis en évidence que les souris C57 dormaient très longtemps sous PF comparées aux autres souches mais elles retrouvent un rythme quasi normal très rapidement après leur réveil. Les souris Balb ont un temps d'anesthésie très court ce qui leur confère un comportement normal au réveil. Cependant, les souris SWISS, dont la durée d'anesthésie est acceptable, ont un réveil très calme, comateux ; leurs gestes sont ralentis et la reprise d'un rythme de vie est long.

Le protocole KMA permet de programmer le réveil en quelque sorte. Cependant, la reprise du mouvement volontaire est compliquée pour toutes les souches qui patinent dans la phase de réveil. Elles sont aptes à marcher mais leur motricité semble altérée temporairement. Les souris SWISS présentent également plus de mouvements de la tête au réveil.

Enfin sous KX, on retrouve un phénomène similaire à PF : les souris SWISS et Balb ont un réveil lent, calme avec une reprise de la marche progressive. Les souris C57 dorment beaucoup plus longtemps mais leur réveil est rapide.

E. Influence d'anesthésies répétées sur l'organisme

Aucun examen visuel pré-anesthésique n'a révélé d'atteinte de l'état général.

Le suivi pondéral a également permis de s'assurer que la prise alimentaire restait correcte entre chaque anesthésie. L'évolution du poids selon la souche des souris révèle que la souche SWISS est plus lourde au même âge que les souches C57 et Balb. Le dimorphisme sexuel du caractère « poids » est également présent et normal : les mâles de chaque souche sont plus gros que les femelles pour un même âge. Les différentes anesthésies ont parfois impliqué un ralentissement de la prise de poids de ces jeunes adultes comme par exemple entre le 17 et 19 juillet. Cependant les courbes ayant une légère pente ascendante, les souris ont globalement pris du poids au cours de l'étude selon la physiologie de la souche considérée.

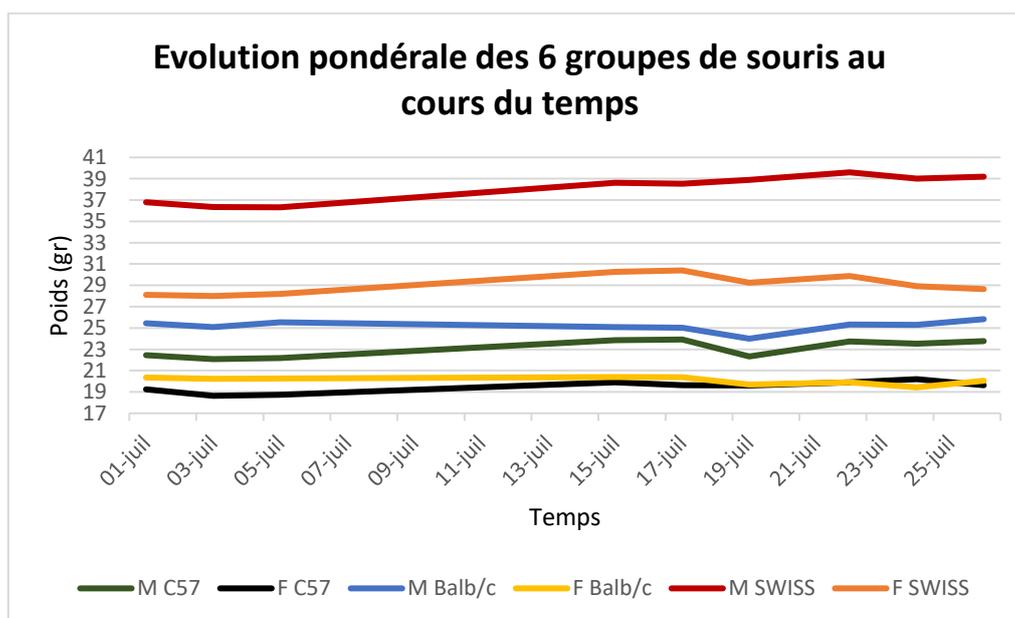


Figure 30: Graphique donnant l'évolution pondérale moyenne des mâles et des femelles de chaque souche au cours du temps

F. Mortalité des souris

1. Causes de mortalité ou d'euthanasie des souris de l'étude principale

Tableau XXVIII: Recensement et cause des décès au cours de l'étude principale

Souche	Sexe	Age (semaines)	Cause décès	Signes ante-mortem
Balb/c	mâle	Entre 7 et 9	Cannibalisme suspecté	/
Balb/c	femelle	9	Arrêt respiratoire 5 minutes Post fin anesthésie PF	Sécrétions salivaires +++ Urines
Balb/c	mâle	10	Cannibalisme suspecté	/
SWISS	mâle	10	Elongation cervicale 30 minutes post fin anesthésie KMA	Vocalises Respiration bouche ouverte immobilité
SWISS	femelle	10	Elongation cervicale 10 minutes post fin anesthésie KMA	Respiration bouche ouverte Fréquence respiratoire augmentée
Balb/c	Mâle	10	Arrêt cardio-respiratoire 5 minutes post injection PF	Sécrétions salivaires Respiration bouche ouverte spasmes

Le bilan total de morts se porte à 6 individus soit 20% des animaux. Il est également compliqué de savoir si les 2 mâles de souche Balb/c sont morts suite à des blessures de congénères ou à cause de séquelles anesthésiques. L'examen clinique visuel réalisé à chaque pesée des souris ne montre jamais d'atteinte physique ou comportementale des animaux.

Deux souris mâles Balb/c sont mortes entre les études anesthésiques suite à des actes de cannibalisme. Cette souche est connue pour un comportement agressif entre mâles comme évoqué précédemment.

Les deux souris SWISS sont mortes après injection de l'atipamézole dans le protocole KMA de la dernière semaine. Elles étaient réveillées mais ne se déplaçaient pas. Les fréquences respiratoires restaient augmentées, la respiration bouche ouverte accompagnait un tirage costal majeur. L'une des deux souris présentait également des vocalises. L'euthanasie de ces deux souris s'est faite par élévation cervicale car elles présentaient une souffrance et une détresse respiratoire due à l'étude.

Une souris Balb/c est morte après le réveil de l'anesthésie PF. Elle présentait des sécrétions muco-respiratoires et de l'urine à proximité de sa tête.

L'autre souris Balb/c a présenté une détresse respiratoire avec la présence de sécrétions et des spasmes au début de l'anesthésie PF. Elle a fait un arrêt cardio respiratoire avant de décider d'une euthanasie.

Aucune souris n'est décédée avec le protocole KX.

Le tableau clinique majeur de mortalité suite à notre étude est une détresse respiratoire qui ne peut pas être prise en charge car nos souris ne sont pas intubées. Le choix d'euthanasie est discutable selon la présence de signes cliniques reflétant une souffrance de l'individu et leur nombre (voir Annexe 2).

Tableau XXIX : Récapitulatif des critères cliniques présents dans notre étude ayant justifiés une euthanasie

Signes cliniques notables (au moins 3)	Signes cliniques sévères (au moins 1)
Vocalisation anormale Respiration anormale	Respiration difficile Suffocations Cris persistants Convulsions Tremblement généralisés

2. Devenir des souris du projet

Les souris de ce projet ont juste été anesthésiées plusieurs fois. Selon la notion de wash-out déjà explicitée, rien ne contre-indique une réhabilitation de ces animaux dans une famille d'accueil. Nous ne souhaitons pas non plus euthanasier ces souris impliquées dans une procédure de classe légère.

Le personnel de l'Ecole d'Oniris avait été informé de la mise à l'adoption des lots de souris. Malheureusement, les conditions de vie demandées étaient assez strictes ; aucun lot des souris n'a trouvé de famille d'accueil.

Il a été proposé aux deux clubs hébergeant de la faune sauvage à l'Ecole d'Oniris soit le club Aquaterra centré sur les reptiles et amphibiens et au Centre de la Faune Sauvage et des Ecosystèmes (CVFSE) ces souris qui constituent un maillon de la chaîne alimentaire.

Pour ce don, aucune réglementation n'est imposée mise à part l'interdiction de mettre ces souris à la reproduction.

Tableau XXX: Récapitulatif des résultats précédents

	Souche	SWISS		Balb/c		C57BL6/J	
	Sexe	mâle	femelle	mâle	femelle	mâle	femelle
Propofol/ Fentanyl	Remarques per anesthésique					Spasmes marqués + opisthotonos urines	
		Anesthésie non chirurgicale					
	Induction (sec)	130*	158*	142	166	152*	180*
	Durée (sec)	1 122*	2 440*	461	777	5 498*	4 538*
	Réveil	lent		rapide		rapide	
Kétamine/ Médétomidine/ Atipamézole	Description per anesthésique	urines		Spasmes modérés		urines	
		Anesthésie non chirurgicale, opacification cornéenne, augmentation fréquence respiratoire après injection d' atipamézole					
	Induction (sec)	83*	89*	102*	121*	114*	86*
	Durée (sec)	2 441*	3 636*	2 269*	2 364*	2 702	2 667
	Réveil	Long et comateux					
Kétamine/ Xylazine	Description per anesthésique					urines	
		Anesthésie non chirurgicale					
	Induction (sec)	162*	128*	165*	188*	113	109
	Durée (sec)	2 423*	2 869*	2 975*	1 919*	5 169*	4 195*
	Réveil	lent		lent		rapide	
Décès (individus / 5)		1	1	3	1	0	0

* résultat significatif

IV. Discussion

A. Matériel et Méthodes

1. Impact d'anesthésies répétées et périodes de wash-out

Dans notre planning, les périodes de wash-out varient de 2 à 10 jours entre les anesthésies. En effet, pour des raisons pratiques, nous n'avons pas travaillé sur les souris âgées de 8 semaines ce qui explique une longue période de lavage entre la 3^{ème} et 4^{ème} anesthésie. Suite au traitement des données statistiques, seuls les résultats des souris âgées de 7 semaines sont exposés. Ainsi, il faut considérer que les 30 souris ont subi trois anesthésies, espacées les unes des autres de 48 heures.

Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la durée minimale nécessaire entre deux anesthésies. Les molécules anesthésiques sont principalement métabolisées et éliminées par le foie et par les reins quelques heures après leur administration. Aussi deux jours entre deux anesthésies semblent corrects (Cagle et al., 2017) sur un mois d'expériences. D'autres auteurs espacent de 10 jours sans fondement (Alves et al., 2007; Erickson et al., 2016).

Dans notre étude, l'anesthésie est le cœur du projet ; aucune autre substance n'est administrée. La réalisation d'une anesthésie doit être justifiée dans un protocole expérimental car elle modifie de façon temporaire les paramètres vitaux de l'animal (diminution de fréquence cardiaque et fréquence respiratoire, hypotension, hypothermie, ...) mais également à moyen terme dans la reprise d'une activité normale de la souris. Des auteurs mettent en garde envers l'interaction possible entre une anesthésie et les résultats obtenus dans une étude. Les manipulateurs doivent donc monitorer au maximum leur anesthésie afin d'éviter tout biais (Bazin et al, 2004).

Pour notre étude, aucun effet secondaire dû aux anesthésies répétées n'a été visible cliniquement ; toutes les souris arrivées au terme des neuf anesthésies avaient un comportement et un développement pondéral normal. L'organisme peut présenter des séquelles physiologiques internes qui n'ont pas été évaluées dans cette étude. Chez l'homme, l'usage de propofol comme anesthésique général pourrait perturber le rythme circadien de régulation de la température, de synthèse de la mélatonine et du cycle jour/nuit (Dubois and Bureau, 2020). Le facteur 'âge' est majeur dans l'apparition de dysfonctionnements cérébraux post-anesthésie ; la durée de l'anesthésie et le type de chirurgie sont des facteurs secondaires (Laalou F-Z, 2010). Anesthésier des rats à l'isoflurane impliquerait des modifications de l'expression de certains gènes au niveau de l'hypothalamus dans les jours suivants l'anesthésie (Culley et al., 2006).

La douleur chez les rongeurs post chirurgie peut être évaluée par une échelle de grimaces faciales (Mouse Grimace Scale) afin d'adapter un traitement analgésique (Matsumiya *et al.*, 2012). Dans notre étude, seule l'injection est une source potentielle de douleur : elle est donc de classe légère. Une étude a analysé l'impact de six anesthésies répétées KX écartées de 3-4 jours sur des souris C57 sur le bien-être : le score de la grille MGS augmente au fur et à mesure des anesthésies. Les souris semblent cependant s'habituer aux anesthésies successives car la sécrétion de cortisol reste identique (Hohlbaum et al., 2018).

L'autre possibilité d'anesthésies répétées est une accoutumance de l'organisme à ces molécules. La répétition d'anesthésie médetomidine/midazolam/fentanyl chez le cochon d'Inde soit 2 par semaine sur trois semaines augmente le métabolisme et permet un réveil plus rapide. Concernant l'isoflurane, la fréquence respiratoire augmente pendant l'induction avec le nombre d'anesthésie (Schmitz *et al.*, 2017). Pour des anesthésies répétées, certains protocoles sont préférables car ils perturbent moins l'organisme ; par exemple, l'isoflurane est fortement dépresseur respiratoire et hypotenseur. Le précédent protocole est plus adapté chez le cochon d'Inde pour des anesthésies successives (Schmitz *et al.*, 2017).

Le facteur 'âge' entre en jeu dans ce phénomène d'accoutumance. Des cas d'accoutumance au propofol chez l'Homme adulte sont possibles tandis que chez l'enfant, la succession d'anesthésies générales pendant 2 ans ne posent pas ce problème dans les cadre de radiothérapie (SEBBAN, consultée le 13/09/20).

L'administration régulière d'une même dose induit une réponse variable à long terme. Certaines études démontrent que le temps anesthésique est plus court et la tolérance chirurgicale présente au départ peut disparaître (Hohlbaum *et al.*, 2018). Il faut donc revoir le dosage des drogues à la hausse.

2. Optimisation des lots

Pour des raisons de coût, d'éthique et pensant que deux jours de wash-out seraient suffisants entre les anesthésies, les trente mêmes souris sont réutilisées pour neuf sessions anesthésiques rapprochées. Cependant, des souris sont mortes naturellement ou lors de complications per-anesthésiques. Le nombre total d'individus a donc diminué et pénalisé certains lots par rapport à d'autres d'où le choix de réduire l'exploitation des résultats à la première semaine d'anesthésies.

L'idéal serait de renouveler cette étude avec un lot de 30 souris naïves pour chaque anesthésie. De plus, aucun wash-out ne serait nécessaire. Des lots plus grands augmenteraient aussi la puissance des tests statistiques.

3. Voies d'injection

La voie IP est pratique d'usage et régulièrement réalisée dans le cadran abdominal droit. En effet, il est possible d'injecter dans un organe abdominal comme la vessie ou le caecum qui ne possède pas de ligament conférant une attache (Uysal *et al.*, 2017). La disposition des organes internes abdominaux n'est pas liée au sexe de la souris comme mentionné dans la partie bibliographique. Dans cette étude, des erreurs liées à l'injection de l'anesthésique sont présentes. Malgré une contention correcte, des souris ont bougé pendant l'injection : la totalité de l'anesthésique a parfois été administré en 2 fois ou bien une partie du produit (équivalent à une goutte soit 0,05 mL) n'a pas été administré. Les anesthésiques étant concentration-dépendant, un sous-dosage peut influencer le temps d'induction et la durée de l'anesthésie.

La voie IP peut aussi être douloureuse et provoquer une irritation locale du péritoine. Les mouvements des rongeurs ou le simple retrait de l'aiguille ont parfois provoqué de petits saignements du tissu cutané résolu par une courte compression locale à l'aide d'une compresse.

L'injection SC d'atipamézole a été correctement réalisée sans contention particulière réalisée entre les omoplates des souris anesthésiées.

La voie d'injection IP ou SC semble ne pas influencer le temps d'induction ni la durée de l'anesthésie sous KX. La voie IP impliquerait une mortalité de 33% des souris tandis qu'aucun décès n'est présent avec la voie SC (Levin-Arama *et al.*, 2016).

Toutes les molécules sont utilisées par voie IP sur les rongeurs. Seul le propofol est normalement injectable uniquement par voie IV car induit une nécrose tissulaire par les autres voies. La voie IP a tout de même été choisie car déjà pratiqué (Alves *et al.*, 2009).

Pour cette étude, un abord veineux aurait été intéressant vu le nombre d'anesthésies réalisées. Cependant, la pose de l'abord veineux chez la souris nécessite lui-même une anesthésie ; c'est un acte très technique.

La question d'un implant télémétrique se pose également pour l'administration répétée des produits anesthésiques par voie IV mais également dans le suivi de plusieurs constantes au cours de l'anesthésie telles que les fréquences respiratoire et cardiaque, la pression artérielle et la température. En dehors des plages de manipulation, l'activité des animaux aurait pu être suivie ainsi que la température corporelle.

4. Subjectivité des manipulateurs

Pour tous les relevés réalisés au cours des anesthésies, le facteur 'manipulateur' entre en jeu et ce surtout pour les paramètres qualitatifs.

L'évaluation de la fréquence respiratoire peut varier de quelques mouvements par rapport à la réalité à cause de la rapidité des mouvements de la cage thoracique. Certaines fréquences respiratoires sont sûrement sous-évaluées. De plus, chaque manipulateur peut oublier de compter certains mouvements respiratoires.

La réalisation des réflexes cutané, podal et caudal est codifié mais la force du manipulateur sur le porte-aiguille peut influencer la force du stimulus infligée à la souris. De plus, l'étude tente de quantifier l'importance du

retrait de la patte suite au pincement, une part de subjectivité entre de nouveau en jeu. C'est pourquoi pour les analyses statistiques, seules les notions de 'présent' et 'absent' sont retenues.

Pour tous les autres mouvements, comme l'évaluation se fait toutes les 5 minutes, certains comportements peuvent être absents au moment du relevé.

5. Paramètres de monitoring et observations

L'optique de cette étude n'était pas d'investir dans une technologie de pointe afin de suivre un maximum de paramètres pendant l'anesthésie des rongeurs. La durée de l'anesthésie et éventuellement son ordre chirurgical devait être évalués à l'aide de trois réflexes, une observation visuelle et la mesure de la fréquence respiratoire. Toutes ces évaluations sont répétables et reproductibles par n'importe qui.

Pour cette étude, la température a été contrôlée au moyen d'un tapis chauffant afin d'éviter une hypothermie aux souris. Certaines études utilisent une sonde rectale adaptée au format de l'animal (Alves *et al*, 2009; Rebecca L Erickson *et al*, 2016). Le seul paramètre vital suivi est la fréquence respiratoire évaluée manuellement en comptant les mouvements de la cage thoracique. La possibilité d'en oublier a déjà été évoquée mais cette solution a l'avantage d'être non envahissante et reproductible à l'infini. Elle est d'ailleurs souvent réalisée (Alves *et al*, 2007; Cagle *et al*, 2017).

L'idéal aurait été de suivre également la fréquence cardiaque, la pression artérielle et poser un ECG pour connaître l'action des molécules sur le système cardio-vasculaire mais cela nécessite du matériel onéreux et adapté comme établi dans la partie bibliographique. Il était déjà compliqué d'évaluer la fréquence respiratoire manuellement ; prendre une fréquence cardiaque au stéthoscope était illusoire. Certains auteurs profitent de système non envahissant comme les électrodes externes (Leal *et al.*, 2006) mais majoritairement la pose de cathéter carotidien (Xu *et al.*, 2007) ou d'implant télémétrique (Lorenz, 2002) est utilisée. De plus, beaucoup d'implants permettent le suivi de plusieurs paramètres pendant les expériences et en dehors comme déjà évoqué.

Concernant le monitoring de la profondeur anesthésique, l'usage des réflexes de retrait de la patte, de pincement de la queue avaient déjà été rapportés (Arras *et al.*, 2001; Buitrago *et al.*, 2008) ; la fréquence de relevé de 5 minutes également. Certains auteurs avaient même indiqué que l'usage du clamp permettait d'appliquer toujours la même force de pincement (Buitrago *et al.*, 2008). Malgré ces précautions, il est possible que la force appliquée par le biais du clamp soit différente selon le manipulateur car nous n'allons pas jusqu'au cran de fermeture sous peine de blesser la souris. La réalisation du geste a parfois été un stimulus de réveil pour les animaux car certains ont présenté un righting reflex juste après la succession des gestes de monitoring.

L'émission d'urines a été observée au cours de l'anesthésie, principalement sous KMA. Des articles ont noté une augmentation de la diurèse sous xylazine ou association KX (Greene *et al*, 1988).

Sous KMA, toutes les souris ont présenté une opacification du cristallin temporaire. Quelques heures post anesthésie, les souris ont montré un globe oculaire normal. L'administration d'OCRYGEL® n'a rien modifié. Certains auteurs décrivent ce phénomène d'opacité cornéenne réversible suite à l'action de la xylazine. Agissant sur les récepteurs alpha2 adrénergiques, il y aurait une modification de composition de l'humeur aqueuse (Calderone, Grimes *et al*, 1986).

Ce protocole a aussi provoqué une augmentation de la fréquence respiratoire visuellement comme l'annonçait une étude (Kiliç and Henke, 2004). Cependant dans notre étude, les relevés de fréquence respiratoire ont seulement révélé une hausse pour la souche SWISS.

6. Influence du rythme circadien

Les anesthésies de l'étude sont réalisées en matinée soit pendant la période de repos des rongeurs pour des raisons d'accès à l'animalerie et d'emploi du temps des personnels. La souris est pourtant un animal nocturne qui se déplace et se nourrit majoritairement la nuit. Il faut donc comprendre que notre étude se place en début de phase de repos chez les rongeurs soit la journée ; leur mode de vie étant inversé par rapport à l'homme.

Le rythme circadien de cette espèce est contrôlé par les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus. Ce rythme biologique est assimilé à une courbe sinusoïdale car les sécrétions hormonales (cortisol et mélatonine notamment) et les variations des paramètres vitaux sont ajustées selon la photopériode. Certains auteurs montrent qu'une anesthésie générale à base de kétamine, propofol ou phénobarbital sur la souris n'a pas le même impact selon le moment d'administration. La perte des réflexes locomoteurs soit du righting reflex est allongé lors d'une anesthésie en début de phase d'activité soit en début de nuit par rapport au début de la phase de repos (Dispersyn et al., 2010). Ceci pourrait être lié à l'activité du récepteur GABA au niveau central. Quelques études ont également montré que selon l'anesthésique choisi et le moment d'injection, le rat et l'être humain peuvent avoir leurs sécrétions de cortisol et de mélatonine, la régulation de leur température corporelle et leur rythme repos/ activité légèrement modifiés en post-opératoire entre 24 et 48 heures.

Notre étude se concentre sur l'étude des temps anesthésiques d'où nous n'avons pas mesuré la cortisolémie ni la sécrétion de mélatonine entre ces anesthésies ; ni relevé la température rectale. Cependant, ces paramètres peuvent indiquer la bonne reprise du rythme activité/repos dans l'enchaînement de plusieurs anesthésies comme fait dans cette étude. L'usage de plusieurs anesthésies successives dans un projet doit également être pris en compte sur l'exploitation des résultats car le rythme biologique des animaux est perturbé en post-opératoire et peut modifier la sécrétion de certaines molécules et leur activité.

Aucune mise à jeun des souris n'a été faite pour des raisons pratiques et surtout vis-à-vis du métabolisme rapide de cette espèce. Pour certains auteurs, les rongeurs ne peuvent pas vomir : cela justifie la non mise à jeun avant une anesthésie (Université de Laval, 2019).

7. Ordre des animaux

Dans cette étude, les souches sont mélangées afin de ne pas endormir toujours les mêmes animaux en premier. Cependant, nous avons toujours anesthésié dans le même ordre : les mâles d'abord puis les femelles pour rendre les manipulations plus visuelles et plus simples. Le biais dû au manipulateur est donc plus important pour les dernières femelles. La répétition du geste peut impliquer une imprécision. De même, le relevé du temps de perte du righting reflex est un peu moins précis pour les animaux endormis en dernier à cause du temps pour noter et manipuler les animaux déjà endormis.

B. Résultats

1. Durée des anesthésies et posologies des molécules

Chaque protocole sera abordé séparément tous sexes et toutes souches confondus.

Concernant l'association KX, cette anesthésie confère une durée entre 32 et 86 minutes dans notre étude. Certains auteurs, avec des posologies plus élevées (K 100mg/kg et X 10mg/kg), ont obtenu une anesthésie plus courte de 20 -30 minutes (Flecknell, 2016) ou du même ordre de temps avec 52 minutes (Buitrago *et al.*, 2008). Augmenter la quantité de xylazine à 20 mg/kg permet d'obtenir une durée de 66 minutes (Arras *et al.*, 2001).

Pour le protocole KMA, l'avantage de pouvoir réverser l'un des composant, la médétomidine, par l'atipamézole est déjà mis en valeur par certains auteurs (Cruz et al, 1998; Taylor et al, 2000; Flecknell, 2018). La voie d'injection diffère de la nôtre chez Taylor qui choisit la voie SC pour KM. La voie IP nous semble plus simple pour injecter l'anesthésique. La voie SC pour l'atipamézole permet une absorption plus lente de la molécule et donc un effet sur la fréquence respiratoire moins puissant.

Ce même auteur conserve la même posologie pour les 2 molécules soit 1 mg/kg ; d'autres multiplient par 2 celle de l'atipamézole (Cruz et al, 1998). Suite à notre étude pilote et au décès de quelques sujets, nous avons choisi un facteur 1/2 entre les 2 molécules.

Nous n'avons pas réalisé d'anesthésie sans atipamézole dans notre étude car le but est de trouver une anesthésie de courte durée pour réaliser des injections intra-nasales et non de connaître l'avantage de l'atipamézole dans un

protocole KMA. La durée d'anesthésie présente une fourchette entre 38 minutes et 1 heure toutes souches confondues.

Enfin le protocole PF a montré une anesthésie très courte de 8 minutes pour certains sujets voire inexistante ou au contraire longue d'1 heure 30. Un auteur a obtenu pour les mêmes posologies (P 100 mg/kg et F 0,2 mg/kg) une anesthésie de 23 minutes en moyenne sur 4 sujets (Alves *et al.*, 2007). Avec une posologie de 50/4 mg/kg, les sujets dorment 4 minutes.

Pour conclure vis-à-vis du projet initial de cette étude sur le modèle murin de l'asthme humain, l'usage du protocole propofol/ fentanyl semble intéressant sur la souche Balb/c.

2. Temps d'induction des anesthésies

Le temps d'induction anesthésique est influencé par divers paramètres : le protocole anesthésique, la souche et le sexe des animaux (voir tableau XXII).

Globalement, le protocole KMA semble induire une perte du righting reflex plus précocément en 1 min 40 sec maximum pour les 3 souches de l'étude. Les deux autres protocoles KX et PF induisent l'anesthésie en 2 min 30 sec et 2 min 40 sec respectivement.

Dans la littérature, on retrouve des données similaires :

- La perte du righting reflex se réalise au bout de 2,7 minutes sous KX aux mêmes posologies pour des mâles C57BL/6J (Erickson *et al.*, 2016). Notre étude a obtenu 113 secondes. Avec une autre souche, des mâles ICR, Kawai obtient 2 minutes 30 sec avec la même posologie et une autre plus basse (K 60 et X 6 mg/kg) (Kawai *et al.*, 2011).
- Les mâles C57B6J de l'étude se sont endormis en 152 secondes sous PF. Pour le même protocole, on recense 4 +/- 1 minutes (Alves *et al.*, 2009).
- Les femelles Balb/c sous KX ont mis entre 170 et 205 secondes pour s'endormir. Une étude sur de sujets âgés de 6 mois et des doses plus élevées (K 100 mg/kg et X 10 mg/kg) indiquait 1,9 minutes (Buitrago *et al.*, 2008).

3. Profondeur anesthésique

Vis-à-vis de la procédure expérimentale décrite dans le chapitre Matériel et Méthodes, il était compliqué de différencier l'intensité du réflexe en pratique. La part de subjectivité propre à chaque manipulateur influence sur le chiffre attribué au mouvement de la souris.

Dans la recherche d'une anesthésie fixe 'flash' pour réaliser des instillations intra-nasales, les trois protocoles permettent d'endormir les souris. Il faut signaler que l'association PF semble peu adaptée aux souris Balb/c car certaines n'ont pas perdu le righting reflex, surtout les mâles. En revanche, aucune anesthésie ne permet de réaliser une chirurgie car la totalité des réflexes n'est quasiment jamais restée absente entre 2 relevés.

Certains auteurs nous indiquent également que les protocoles KX (100 mg/kg et 20 mg/kg) et KM (100 mg/kg et 1 mg/kg) ne permettent pas d'obtenir une anesthésie chirurgicale sur des souris Balb/c (Arras *et al.*, 2001). Parfois, seules les concentrations des molécules peuvent permettre ou non une chirurgie : au même dosage que cette étude, des auteurs indiquent clairement qu'aucun temps chirurgical n'est possible et qu'il faut augmenter les doses (Levin-Arama *et al.*, 2016). Sous PF, malgré trois posologies différentes, un seul individu C57 a atteint le seuil chirurgical (Alves *et al.*, 2009). D'autres en revanche démontrent que sous KX, 75% des souris atteignent le palier chirurgical. Une grande variation de la durée de ce temps chirurgical est présente : entre 5 et 50 minutes (Jaber *et al.*, 2014).

La profondeur anesthésique pourrait également varier avec le nombre d'anesthésies subies par l'individu. Ceci n'a finalement pas été étudié dans notre étude. Pour des C57, la répétition du protocole KX (K 80 mg/kg et X 16 mg/kg) six fois entraîne la disparition pour quelques souris de la possibilité chirurgicale (Hohlbaum *et al.*, 2018).

4. Influence du sexe sur l'anesthésie

Le facteur 'sexe' influe sur le temps d'induction et la durée anesthésique. Seules deux associations n'ont pas montré de différence sur la durée de l'anesthésie : Balb / PF et C57 / KMA. Les variations liées au sexe sont plus ou moins grande selon les souches. Enfin, il n'y a jamais un sexe particulier qui implique toujours un temps anesthésique plus court. Des variations également sur le comportement au réveil et la reprise d'activité sont visibles dans cette étude.

En général, les études incluant des rongeurs n'utilisent qu'une seule souche et un seul sexe. Ce choix est parfois justifié pour s'affranchir du cycle œstral des hormones sexuelles (Jaber et al, 2014). Mais certains auteurs prévoient dans leur matériel et méthodes des mâles et femelles pour vérifier s'il y a bien une variation sans que ce soit mentionné dans les résultats (Erickson et al, 2016). Des auteurs aboutissent à des temps d'immobilisation similaires pour les mâles et femelles d'une même souche par voie IP sous KX (Levin-Arama et al., 2016).

Certaines études ciblent au contraire leur sujet pour démontrer des variations entre les mâles et les femelles. Sous KM (K 35 mg/kg et M 0,5 mg/kg), les femelles SWISS ne dorment pas ; avec une posologie identique à l'étude, les doses permettent une bonne anesthésie. Toutefois, la posologie de la kétamine peut être réduite à 40 mg/kg pour les mâles (Cruz et al., 1998).

Le sexe de l'animal pourrait également influencer le caractère chirurgical d'une anesthésie : sous KX, l'atteinte de la possibilité chirurgicale est plus longue par une perte moins rapide du réflexe podal chez les femelles. De même, ce palier chirurgical est de durée plus courte chez les femelles (Levin-Arama et al., 2016).

Une étude éthologique a mis en évidence un impact sur le bien-être d'anesthésies KX répétées chez la souris C57 : les femelles voient leur bien-être perturbé à court terme (anxiété, appétit, grimaces faciales) comparées aux mâles (Hohlbaum et al., 2018).

Toutes ces remarques nous amènent à retenir que les doses anesthésiques doivent être adaptées au sexe des animaux. Dans une étude où les 2 sexes sont en jeu, une même anesthésie générale peut influencer les résultats expérimentaux car les animaux ne réagissent pas de la même façon. Dans les études pharmacocinétiques, on sait que les rats mâles et femelles ne possèdent pas toujours les mêmes cytochromes ce qui leur confèrent un métabolisme hépatique différent (Czerniak, 2001) .

5. Influence de l'âge

Comme indiqué auparavant, l'influence de l'âge n'a pas été évaluée dans l'analyse statistique. Les mêmes souris ont été réutilisées ce qui a donné lieu à deux soucis : certains individus sont morts au cours de l'étude réduisant la taille des échantillons et le phénomène d'accoutumance étant peu connu, il est impossible de savoir si la répétition d'anesthésie a impacté les résultats.

Notre étude s'est portée sur des souris de 7 semaines donc jeunes adultes car la majorité des modèles souris d'expérimentation ont entre 6 et 20 semaines (Jackson et al., 2017). De plus, dans l'étude impliquant des instillations intra-nasales, les souris ont 6 semaines au départ.

Certains auteurs ont évoqué que comme chez l'Homme, l'accoutumance aux molécules anesthésiques varie avec l'âge (SEBBAN, consultée le 13/09/20).

6. Influence de la souche

Des variations du temps d'induction et de la durée d'anesthésie sont notées selon la souche pour un même protocole (voir figure 29).

Certains auteurs ont comparé trois souches également ; par exemple sous KX (K 191,25 mg/kg et X 4,25mg/kg), les seules souris de la souche ICR présentent un temps anesthésique significativement plus court que les souris Balb et C57 (Levin-Arama et al., 2016).

La souche n'influe pas que sur les paramètres quantitatifs mais également sur le comportement pendant l'anesthésie. Des positions d'opisthotonos sont présentes chez la souche C57 sous PF : cette association est à éviter

car les souris ont un sommeil peu homogène troublé par de grandes apnées. Certains auteurs indiquent que les souris C57 sous PF présentent des spasmes musculaires qui sont difficiles à différencier d'un réflexe de retrait de la patte. Des concentrations très grandes en propofol permettent bien une perte de ce réflexe mais impliquent une dépression respiratoire majeure entraînant la mort des souris (Alves et al., 2009).

Certains auteurs choisissent une souche en lien avec le projet d'étude. Par exemple, dans le cadre de recherches en lien avec le diabète, on utilise souvent des souris prédisposée génétiquement à cette maladie. D'autres auteurs justifient leur choix par rapport à la fréquence d'usage d'une souche (Buitrago *et al.*, 2008).

7. Taux de mortalité

Pendant la première semaine d'expérimentation, aucune souris n'est décédée ou n'a présenté de signes sous anesthésie inclus dans les points limites. Malgré la non exploitation des résultats des souris à 9 et 10 semaines, la mortalité de 20% des animaux est indiquée dans les résultats car majeure. Dans certains cas, il est difficile de savoir si la mort des souris est une conséquence directe d'anesthésies répétées ou si elle est simplement liée à un problème comportemental ou une maladie sous-jacente. Il est tout de même normal de supposer que la répétition d'anesthésies sur les souris soit un facteur favorisant la mortalité et doit être pris en compte dans une étude. Aucune souris n'est décédée à proximité d'une anesthésie KX : elle semble donc plus sûre que les deux autres. Il faut également noter que le protocole PF est délétère pour la souche Balb tout comme KMA l'est pour la souche SWISS.

Sous PF, l'augmentation de la dose de propofol implique une hausse de la mortalité suite à une forte dépression respiratoire. Malgré des spasmes et contractions musculaires et des apnées marquées, aucune souris C57 n'est morte suite au protocole PF (Alves et al., 2009).

8. Influence de l'anesthésie sur l'évolution pondérale

Il eut été possible de croire que l'accumulation d'anesthésies pouvait affecter voire ralentir la croissance des souris en perturbant leur métabolisme et aussi le rythme circadien. La pesée avant chaque intervention nous permet de calculer la juste dose d'anesthésique à injecter et également construire une courbe de poids et donc vérifier le bien-être des animaux. En effet, la perte de plus de 10% de la masse corporelle des rongeurs peut être un motif d'euthanasie. La comparaison des courbes de croissance transmises sur le site internet de Janvier Labs (voir figures 8 à 10) avec celles obtenues pour les souris de l'étude ne montrent pas de ralentissement de prise de poids pour les souris de chaque souche. La différence mâle / femelle d'une même souche est également remarquée dans notre étude.

Conclusion

L'usage d'animaux dans l'expérimentation animale remonte à l'Antiquité et reste aujourd'hui une obligation malgré une volonté de développer des méthodes alternatives. Cet usage est très cadré en France : leur hébergement et leur implication dans les projets répondent à des lois découlant de la Directive 2010/63. Le secteur de la recherche se veut le plus transparent possible afin de répondre aux nouvelles attentes du grand public. La souris demeure l'espèce de choix pour près de 60% des projets expérimentaux. La diversité de souches et donc des modèles animaux qu'offre cette espèce est un point non négligeable.

L'anesthésie est un acte anodin à première vue car couramment pratiqué. Des recommandations de protocole et de monitoring existent en médecine vétérinaire afin de bien s'adapter à l'animal et d'assurer une surveillance adéquate.

Dans le cadre d'un travail sur l'asthme humain, des souris Balb/c font l'objet d'une anesthésie fixe kétamine/xylazine afin de réaliser des instillations intra-nasales. Cette étude a amené le travail de cette thèse pour rechercher un protocole anesthésique fixe de courte durée et à moindre impact sur le rythme biologique des rongeurs.

La comparaison de trois protocoles kétamine/xylazine ; kétamine/médétomidine/atipamézole et propofol/fentanyl est réalisée sur 3 souches assez communes en recherche : la Balb/c, la C57BL/6J, et la SWISS. Le monitoring d'anesthésie se veut simple mais exhaustif.

Notre travail révèle des variations à divers degrés ; plusieurs paramètres influencent une anesthésie : le protocole en lui-même, la souche et le sexe des souris. Les réactions comportementales per-anesthésiques peuvent varier d'une souche à l'autre mais la croissance pondérale ne semble pas affectée par les anesthésies répétées. Dans notre étude, l'influence de l'âge n'a finalement pas été retenue au vu de la petite taille des échantillons et seule une voie d'injection a également été utilisée.

Dans le contexte expérimental des modèles d'asthme humain chez la souris, le protocole propofol/fentanyl sur les souris Balb/c peut être préconisé compte-tenu de la faible durée d'anesthésie générée.

Ce travail pourrait être complété avec des échantillons plus grands et quelques ajustements des doses des molécules utilisées. Certains points d'amélioration pourraient concerner la mesure des paramètres de suivi anesthésique par télémétrie et une analyse comportementale plus complète et plus longue.

Le choix d'une anesthésie doit être réfléchi et justifié dans un projet de recherche car elle peut modifier des paramètres vitaux des animaux et donc influencer les résultats.

Le choix d'une anesthésie doit être réfléchi et justifié dans un projet de recherche car elle peut modifier des paramètres vitaux des animaux et donc influencer les résultats.

Bibliographie

ACVA, american C. of veterinary A. and analgesia (2009) *Recommendations for monitoring anesthetized veterinary patients*. Available at: <https://acvaa.org/wp-content/uploads/2019/05/Small-Animal-Monitoring-Guidlines.pdf> (Accessed: 6 April 2020).

AEENVN, A. des élèves de l'ENVN (2017) *Animaux de compagnie 2017*. Le Point V.

AFAR Association Francophone des Amateurs de Rongeurs (no date) *Les sens de la souris* –. Available at: <http://afar-asbl.net/info/?p=2811> (Accessed: 11 April 2020).

Alves, H. C. *et al.* (2007) 'Intraperitoneal propofol and propofol fentanyl, sufentanil and remifentanil combinations for mouse anaesthesia', *Laboratory Animals*, 41(3), pp. 329–336. doi: 10.1258/002367707781282767.

Alves, H. C. *et al.* (2009) 'Intraperitoneal anaesthesia with propofol, medetomidine and fentanyl in mice', *Laboratory Animals*, 43(1), pp. 27–33. doi: 10.1258/la.2008.007036.

Animal Research. Info (2018) *Les primates | ari.info | ari.info*. Available at: <http://www.animalresearch.info/fr/concevoir-la-recherche/animaux-de-recherche/les-primates/> (Accessed: 11 April 2020).

Anses (2017) *Cadre réglementaire – code de la santé publique Médicaments vétérinaires classés stupéfiants*. Available at: <http://ansm.sante.fr/Declarer-un-effet-indesirable/Pharmacodependance-> (Accessed: 2 April 2020).

Anses, A. nationale de sécurité sanitaire and de l'alimentation, de l'environnement et du travail (no date) *Autorisation de mise sur le marché (AMM) médicaments vétérinaires*. Available at: <https://www.anses.fr/fr/content/autorisation-de-mise-sur-le-marche-amm-medicaments-veterinaires%0D> (Accessed: 1 April 2020).

Arras, M. *et al.* (2001) 'Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: Drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth', *Comparative Medicine*, 51(5), pp. 443–456.

Arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles | Legifrance (2013). Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027037983&categorieLien=id> (Accessed: 11 April 2020).

Arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions de fourniture de certaines espèces animales utilisées à des fins scientifiques aux établissements utilisateurs agréés | Legifrance (no date). Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027037949&categorieLien=id> (Accessed: 11 April 2020).

Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques | Legifrance (no date). Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027037960&categorieLien=id> (Accessed: 13 April 2020).

Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales | Legifrance (2013). Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027038013&categorieLien=id> (Accessed: 11 April 2020).

- Arrêté du 1er février 2013 relatif à la délivrance et à l'utilisation de médicaments employés par les établissements agréés en tant qu'utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques* | Legifrance (2013). Available at: https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=CB05A771283AFD835ED044ACC45FBD4A.tplgfr38s_1?cidTexte=JORFTEXT000027038051&dateTexte=20130207 (Accessed: 11 April 2020).
- Arrêté du 22 février 1990 fixant la liste des substances classées comme stupéfiants* | Legifrance (no date). Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000533085> (Accessed: 13 April 2020).
- Arrêté du 22 février 1990 fixant la liste des substances psychotropes* | Legifrance (no date). Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000533087> (Accessed: 13 April 2020).
- Arrêté du 22 février 1990 portant inscription sur les listes I et II des substances vénéneuses définies à l'article R.5204 du code de la santé publique* | Legifrance (no date). Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000350453&categorieLien=cid> (Accessed: 13 April 2020).
- Arrêté du 31 juillet 2003 portant application de la réglementation des stupéfiants aux médicaments à base de kétamine et aux médicaments à base de tilétamine* | Legifrance (no date). Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000245555&categorieLien=id> (Accessed: 13 April 2020).
- ASA Physical Status Classification System* | American Society of Anesthesiologists (ASA) (no date). Available at: <https://www.asahq.org/standards-and-guidelines/asa-physical-status-classification-system> (Accessed: 5 April 2020).
- Association Française des Sciences et Techniques des Animaux de Laboratoire (AFSTAL) (2016) *Liste des Fournisseurs*. Available at: <http://www.alphavisa.com/annuaire-afstal/2016/documents/fournisseurs-AnnuaireAFSTAL2016.pdf> (Accessed: 10 April 2020).
- Association Française des Sciences et Techniques des Animaux de Laboratoire (AFSTAL) (2020) *Présentation*. Available at: www.afstal.com.
- Barter, L. S. and Hopper, K. (2011) 'Transcutaneous monitor approximates PaCO₂ but not PaO₂ in anesthetized rabbits', *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. Elsevier, 38(6), pp. 568–575. doi: 10.1111/J.1467-2995.2011.00662.X.
- Bauer, C. *et al.* (2019) 'Comparison of pre-emptive butorphanol or metamizole with ketamine + medetomidine and s-ketamine + medetomidine anaesthesia in improving intraoperative analgesia in mice.', *Laboratory animals*. SAGE Publications Ltd, 53(5), pp. 459–469. doi: 10.1177/0023677218815208.
- Bazin, J. E., Constantin, J. M. and Gindre, G. (2004) 'Laboratory animal anaesthesia: Influence of anaesthetic protocols on experimental models', *Annales Francaises d'Anesthesie et de Reanimation*. Elsevier Masson SAS, 23(8), pp. 811–818. doi: 10.1016/j.annfar.2004.05.013.
- Beier, H. *et al.* (2007) 'Peritoneal microdialysis in freely moving rodents: An alternative to blood sampling for pharmacokinetic studies in the rat and the mouse', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier, 30(1), pp. 75–83. doi: 10.1016/j.ejps.2006.10.005.
- Beloil, H. and Mazoit, J. X. (2009) 'Effet des anesthésiques locaux sur la réponse inflammatoire postopératoire', *Annales Francaises d'Anesthesie et de Reanimation*. Elsevier Masson, pp. 231–237. doi: 10.1016/j.annfar.2008.12.021.
- Bogdanske, J. J. and Hubbard-Van Stelle (2010) *Laboratory Mouse: Procedural techniques Manual and*

DVD. Edited by L. Wisconsin Alumni Research Foundation. CRC Press.

Bouchaud (no date) *Saisine du projet: Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'asthme sévère avec remodelage bronchique*.

Brammer, A., West, C. D. and Allen, S. L. (1993) *A comparison of propofol with other injectable anaesthetics in a rat model for measuring cardiovascular parameters, Laboratory Animals*.

Buitrago, S. *et al.* (2008) 'Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 47(1), pp. 11–17.

Burburan, S. M. *et al.* (2014) 'Effects of inhalational anaesthetics in experimental allergic asthma', *Anaesthesia*. Blackwell Publishing Ltd, 69(6), pp. 573–582. doi: 10.1111/anae.12593.

Cagle, L. A. *et al.* (2017) 'Injectable Anesthesia for Mice: Combined Effects of Dexmedetomidine, Tiletamine-Zolazepam, and Butorphanol', *Anesthesiology Research and Practice*, 2017. doi: 10.1155/2017/9161040.

Calderone, L., Grimes, P. and Shalev, M. (1986) *Acute Reversible Cataract Induced by Xylazine and by Ketamine-Xylazine Anesthesia in Rats and Mice, Eqn. Eye Res*.

Capdevila, S. *et al.* (2007) *Acclimatization of rats after ground transportation to a new animal facility*.

Caroline Gilbert (2020) 'No Title', in *Comportement & bien-être: rongeurs & lagomorphes*.

CCPA (2020) *Trois R*. Available at: <https://3rs.ccac.ca/fr/a-propos/trois-r.html> (Accessed: 11 April 2020).

Chen, P. H. *et al.* (2016) 'Subcutaneous meloxicam suspension pharmacokinetics in mice and dose considerations for postoperative analgesia', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Blackwell Publishing Ltd, 39(4), pp. 356–362. doi: 10.1111/jvp.12297.

Chia, R. *et al.* (2005) 'The origins and uses of mouse outbred stocks', *Nature Genetics*, 37(11), pp. 1181–1186. doi: 10.1038/ng1665.

Clinisciences (no date) *Génotypage de souris*. Available at: <https://www.clinisciences.com/achat/cat-genotypage-de-souris-3500.html> (Accessed: 12 April 2020).

CRBX, C. de R. B. X. (no date) *Le Xénope*. Available at: <https://xenopus.univ-rennes1.fr> (Accessed: 3 April 2020).

Cruz, J. I., Loste, J. M. and Burzaco, O. H. (1998) 'Observations on the use of medetomidine/ketamine and its reversal with atipamezole for chemical restraint in the mouse', *Laboratory Animals*, 32(1), pp. 18–22. doi: 10.1258/002367798780559383.

Culley, D. J. *et al.* (2006) 'Altered hippocampal gene expression 2 days after general anesthesia in rats', *European Journal of Pharmacology*. Eur J Pharmacol, 549(1–3), pp. 71–78. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.08.028.

Das, R. G. and North, D. (2007) 'Implications of experimental technique for analysis and interpretation of data from animal experiments: Outliers and increased variability resulting from failure of intraperitoneal injection procedures', *Laboratory Animals*, 41(3), pp. 312–320. doi: 10.1258/002367707781282802.

Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques / Legifrance (no date). Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027037840&categorieLien=id> (Accessed: 13 April 2020).

Delphine Bouard (no date) *TECHNIQUES D'ADMINISTRATION ET DE PRELEVEMENT CHEZ L'ANIMAL DE LABORATOIRE*.

Delphine Bouard, V. (no date) *Soins péri opératoires dans les cours réglementaires à la pratique*

chirurgicale.

Desfontis JC., Mallem Y., G. M. (2017) *Médicaments des grandes fonctions*. Nantes.

Diehl, K. H. *et al.* (2001) 'A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes', *Journal of Applied Toxicology*. John Wiley & Sons, Ltd, 21(1), pp. 15–23. doi: 10.1002/jat.727.

Dispersyn, G., Chassard, D. and Pain, L. (2010) 'L'anesthésie-réanimation et les rythmes biologiques', *Annales Francaises d'Anesthesie et de Reanimation*. Elsevier Masson, pp. 470–477. doi: 10.1016/j.annfar.2010.05.005.

Dubois, G. and Bureau, L. (2020) 'The body's biological rhythms and clocks', *Actualites Pharmaceutiques*. Elsevier Masson SAS, 59(597), pp. 8–11. doi: 10.1016/S0515-3700(20)30284-6.

ECOPA/Francopa (2018) *Comment les nouveaux outils de la biologie font-ils évoluer le concept des 3R ?* Paris. Available at: <http://www.francopa.fr/web/francopa?page=newsletterFile&id=93104> (Accessed: 11 April 2020).

Erickson, Rebecca L *et al.* (2016) 'Intraperitoneal Continuous-Rate Infusion for the Maintenance of Anesthesia in Laboratory Mice (*Mus musculus*).', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 55(5), pp. 548–57. doi: 10.1016/j.jneumeth.2003.09.026.

Erickson, Rebecca L. *et al.* (2016) 'Intraperitoneal continuous-rate infusion for the maintenance of anesthesia in laboratory mice (*Mus musculus*)', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 55(5), pp. 548–557.

Erickson, R. L. *et al.* (2019) 'Alfaxalone-xylazine anesthesia in laboratory mice (*Mus musculus*)', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. American Association for Laboratory Animal Science, 58(1), pp. 30–39. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-18-000010.

European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM): its role and contribution | EU Science Hub (no date). Available at: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/contributions-conferences/european-centre-validation-alternative-methods-ecvam-its-role-and-contribution> (Accessed: 4 October 2020).

Fairbanks, C. A. (2003) 'Spinal delivery of analgesics in experimental models of pain and analgesia', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier, 55(8), pp. 1007–1041. doi: 10.1016/S0169-409X(03)00101-7.

Fish, Brown, Danneman, K. (2009) *Anesthesia and analgesia in laboratory animals, Second Edition*. Elsevier.

Flecknell, P. (2016) *Laboratory Animal Anaesthesia*. Elsevier. Sara Tenney.

Flecknell, P. (2018) 'Rodent analgesia: Assessment and therapeutics', *Veterinary Journal*, 232, pp. 70–77. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.12.017.

Gades, N. M. *et al.* (2000) 'The Magnitude and Duration of the Analgesic Effect of Morphine, Butorphanol, and Buprenorphine in Rats and Mice', *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 39(2), pp. 8–13.

Gallos, G. *et al.* (2004) 'Local anesthetics reduce mortality and protect against renal and hepatic dysfunction in murine septic peritonitis', *Anesthesiology*, 101(4), pp. 902–911. doi: 10.1097/00000542-200410000-00015.

Green, C J *et al.* (1981) *Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience, Laboratory Animals*.

Green, C. J. *et al.* (1981) 'Metomidate, etomidate and fentanyl as injectable anaesthetic agents in mice',

Laboratory Animals, 15(2), pp. 171–175. doi: 10.1258/002367781780958919.

GREENE, S. A. and THURMON, J. C. (1988) 'Xylazine – a review of its pharmacology and use in veterinary medicine', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 295–313. doi: 10.1111/j.1365-2885.1988.tb00189.x.

Groupe de Réflexion Interprofessionnel sur la Communication en Recherche, G. (no date) *Découvrir la recherche animale | Recherche animale*. Available at: <https://www.recherche-animale.org/decouvrir-la-recherche-animale> (Accessed: 31 March 2020).

Gueders, M. M. *et al.* (2009) 'Mouse models of asthma: A comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production', *Inflammation Research*. Springer, 58(12), pp. 845–854. doi: 10.1007/s00011-009-0054-2.

Hachem, P. (2006) *Etude de l'implication des cellules iNKT dans l'asthme allergique expérimental*. Université René Descartes- Paris Vème. Available at: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00084723> (Accessed: 7 April 2020).

Hamelmann, E. *et al.* (1997) 'Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. American Thoracic Society, 156(3 I), pp. 766–775. doi: 10.1164/ajrccm.156.3.9606031.

Hardin-Pouzet, H. and Morosan, S. (2019) 'Des souris, des rats et des hommes - En quoi les modèles rongeurs restent indispensables pour la production de connaissances', *médecine/sciences*. EDP Sciences, 35(5), pp. 479–482. doi: 10.1051/medsci/2019082.

Hedenqvist, P., Roughan, J. V and Flecknell, P. A. (2000) 'Effects of repeated anaesthesia with ketamine/medetomidine and of pre-anaesthetic administration of buprenorphine in rats.', *Laboratory animals*. Royal Society of Medicine Press Ltd, 34(2), pp. 207–11. doi: 10.1258/002367700780457536.

Hohlbaum, K. *et al.* (2018) 'Within the scope of the 3Rs of Russel and Burch, the number of laboratory animals can be reduced by repeated use of an animal. This strategy only becomes relevant, if the total amount of pain, distress or harm the individual animal experiences does not ex', *PLOS ONE*, 13(9). Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0203559>.

Implant télémétrique pour la recherche animale / pour petits animaux / d'activité / de glycémie - HD-XG - DSI (no date). Available at: <https://www.medicalexpo.fr/prod/dsi/product-85297-900853.html> (Accessed: 6 April 2020).

Inserm (2009) *GUIDE PRATIQUE Recommandations pour la mise en place et le fonctionnement d'un Etablissement d'Expérimentation Animale utilisant des rongeurs et des lagomorphes*. Available at: https://www.inserm.fr/sites/default/files/media/entity_documents/Inserm_RecommandationsEtablissementsExperimentationAnimale_2009.pdf (Accessed: 10 April 2020).

Inserm (no date) *La réglementation et l'éthique de l'expérimentation animale | Inserm - La science pour la santé*. Available at: <https://www.inserm.fr/recherche-inserm/ethique/utilisation-animaux-fins-recherche/reglementation-et-ethique-experimentation-animale> (Accessed: 11 April 2020).

Institut Pasteur (Jaubert; no date). Diaporama: *Modèles animaux : génétique de la souris*. Available at: [lvts.fr/download/other_universities/formation_expérimentation_animale_lvl_1_paris_6_universite/genetique_appliquee.pdf](https://www.institut-pasteur.fr/medias/telechargement/autres_universites/formation_expérimentation_animale_lvl_1_paris_6_universite/genetique_appliquee.pdf) (Accessed: 10 April 2020).

Jaber, S. M. *et al.* (2014) 'Dose regimens, variability, and complications associated with using repeat-bolus dosing to extend a surgical plane of anesthesia in laboratory mice', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 53(6), pp. 684–691.

Jackson, S. J. *et al.* (2017) 'Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes', *Laboratory Animals*, 51(2), pp. 160–169. doi: 10.1177/0023677216653984.

- Jean-Dominique, P. (2016) *Pharmacocinétique, notes de cours*. Nantes.
- Jirkof, P. *et al.* (2015) 'Buprenorphine for pain relief in mice: repeated injections vs sustained-release depot formulation', *Laboratory Animals*, 49(3), pp. 177–187. doi: 10.1177/0023677214562849.
- Kawai, S. *et al.* (2011) 'Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice', *Experimental Animals*, 60(5), pp. 481–487. doi: 10.1538/expanim.60.481.
- Khokhlova, O. N. *et al.* (2017) 'Using Tiletamine-Zolazepam-Xylazine Anesthesia Compared to CO₂-inhalation for Terminal Clinical Chemistry, Hematology, and Coagulation Analysis in Mice', *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. Elsevier Inc., 84, pp. 11–19. doi: 10.1016/j.vascn.2016.10.005.
- Kiliç, N. and Henke, J. (2004) 'Comparative Studies on the Effect of S(+)-Ketamine-Medetomidine and Racemic Ketamine-Medetomidine in Mouse', pp. 15–17.
- La protection juridique des animaux | Atelier - Sous l'écorce* (no date). Available at: <http://www.atelier-souslecorce.fr/> (Accessed: 4 October 2020).
- Laalou F-Z, P. L. (2010) 'TOXICITÉ "CÉRÉBRALE" DES ANESTHÉSIIQUES CHEZ LE SUJET ÂGÉ'. Available at: https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/Les_nouvelles_RFE_ambulatoires_de_la_SFAR_quoi_de_neu_f.pdf (Accessed: 13 September 2020).
- Langford, D. J. *et al.* (2010) 'Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse', *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 7(6), pp. 447–449. doi: 10.1038/nmeth.1455.
- Leal, T. *et al.* (2006) 'Successful protocol of anaesthesia for measuring transepithelial nasal potential difference in spontaneously breathing mice', *Laboratory Animals*, 40(1), pp. 43–52. doi: 10.1258/002367706775404480.
- Les médicaments de la douleur : les paliers de l'OMS - Fédération Hospitalière de France (FHF)* (no date). Available at: <https://www.fhf.fr/content/view/full/64922> (Accessed: 2 April 2020).
- Levin-Arama, M. *et al.* (2016) 'Subcutaneous compared with intraperitoneal ketamine-xylazine for anesthesia of mice', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. American Association for Laboratory Animal Science, 55(6).
- Levin-Arama M, Abraham L, Waner T (2016) 'Subcutaneous compared with intraperitoneal ketamine-xylazine for anesthesia of mice', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 55(6), pp. 794–800. Available at: <https://www.mendeley.com/catalogue/5e95116e-0794-3508-b6f8-923e80b1dd81/> (Accessed: 5 April 2020).
- Lorenz, J. N. (2002) 'A practical guide to evaluating cardiovascular, renal, and pulmonary function in mice', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 282(6 51-6). doi: 10.1152/ajpregu.00759.2001.
- Ma, R. *et al.* (2010) 'Dexamethasone attenuated bupivacaine-induced neuron injury in vitro through a threonine-serine protein kinase B-dependent mechanism', *Neuroscience*, 167(2), pp. 329–342. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.12.049.
- Madouri, F. (2014) *Asthme allergique induit par un allergène d'acarien, House Dust Mite (HDM) : rôles de la caspase-1 et de la protéine kinase C thêta (PKC- θ)*. Université d'Orléans. Available at: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01374855> (Accessed: 7 April 2020).
- Mähler, M. *et al.* (2014) 'FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units', *Laboratory Animals*, 48(3), pp. 178–192. doi: 10.1177/0023677213516312.
- Matsumiya, L. C. *et al.* (2012) 'Using the Mouse Grimace Scale to Reevaluate the Efficacy of

- Postoperative Analgesics in Laboratory Mice', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. American Association for Laboratory Animal Science, 51(n°1), pp. 42–49.
- McGovern, T. K. *et al.* (2013) 'Evaluation of respiratory system mechanics in mice using the forced oscillation technique', *Journal of Visualized Experiments*, (75), p. e50172. doi: 10.3791/50172.
- MESRI (2019) *L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques en 2017 : des chiffres très proches de ceux de 2016*. Available at: https://cache.media.enseignementsup-recherche.gouv.fr/file/utilisation_des_animaux_fins_scientifiques/28/7/utilisation_animaux_fins_scientifiques_2017_1116287.pdf%0D.
- MGI-Mouse Gene Expression Database (GXD)* (no date). Available at: <http://www.informatics.jax.org/expression.shtml> (Accessed: 11 April 2020).
- Miranda, A., Pêgo, J. M. and Correia-Pinto, J. (2017) 'Animal facility videoendoscopic intubation station: tips and tricks from mice to rabbits.', *Laboratory animals*. SAGE Publications Ltd, 51(2), pp. 204–207. doi: 10.1177/0023677216652342.
- Miranda, H. F. *et al.* (2008) 'Isobolographic analysis of multimodal analgesia in an animal model of visceral acute pain', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Elsevier, 88(4), pp. 481–486. doi: 10.1016/j.pbb.2007.10.005.
- Mogil, J. S. *et al.* (2005) 'Influence of nociception and stress-induced antinociception on genetic variation in isoflurane anesthetic potency among mouse strains', *Anesthesiology*, 103(4), pp. 751–758. doi: 10.1097/00000542-200510000-00013.
- Mouedden, M. El and Meert, T. F. (2005) 'Evaluation of pain-related behavior, bone destruction and effectiveness of fentanyl, sufentanil, and morphine in a murine model of cancer pain', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Elsevier, 82(1), pp. 109–119. doi: 10.1016/j.pbb.2005.07.016.
- Olson, M. E. *et al.* (1994) 'The parasympatholytic effects of atropine sulfate and glycopyrrolate in rats and rabbits', *Canadian Journal of Veterinary Research*, 58(4), pp. 254–258.
- Paigen, B. *et al.* (1985) 'Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice', *Atherosclerosis*. doi: 10.1016/0021-9150(85)90138-8.
- Patti, C. L. *et al.* (2005) 'Behavioral characterization of morphine effects on motor activity in mice', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Elsevier, 81(4), pp. 923–927. doi: 10.1016/j.pbb.2005.07.004.
- Plevry, B. J. (1978) *A STUDY OF THE ENHANCED TOXICITY OF DOXAPRAM IN RODENTS TREATED WITH NARCOTIC ANALGESICS*, *Br.J. Anaesth.*
- Pottie, R. G. *et al.* (2007) 'Effect of hypothermia on recovery from general anaesthesia in the dog', *Australian Veterinary Journal*, 85(4), pp. 158–162. doi: 10.1111/j.1751-0813.2007.00128.x.
- Reimer, J. *et al.* (no date) 'Intraperitoneal injection of sodium pentobarbital is associated with pain in rats.', *bioRxiv Physiology*. doi: 10.1101/703173.
- RTFlash Recherche et Technologie (2002) *La comparaison du génome de l'homme et de la souris ouvre de vastes perspectives thérapeutiques*. Available at: <https://www.rtflash.fr/comparaison-genome-l-homme-et-souris-ouvre-vastes-perspectives-therapeutiques/article> (Accessed: 12 April 2020).
- Schmitz, S. *et al.* (2017) 'Repeated anaesthesia with isoflurane and medetomidine-midazolam-fentanyl in guinea pigs and its influence on physiological parameters', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 12(3). doi: 10.1371/journal.pone.0174423.
- Schuster, C. J. and Pang, D. S. J. (2018) 'Forced-air pre-warming prevents peri-anaesthetic hypothermia and shortens recovery in adult rats.', *Laboratory animals*. SAGE Publications Ltd, 52(2), pp. 142–151. doi: 10.1177/0023677217712539.

- SEBBAN, H. (no date) 'Anesthésie itératives en pédiatrie: expérience en radiothérapie'. Available at: <https://www.icarweb.fr/IMG/pdf/12-15.pdf> (Accessed: 13 September 2020).
- Shaftel, S. S. *et al.* (2003) 'COX-3: A splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells', *Molecular Brain Research*. Elsevier, 119(2), pp. 213–215. doi: 10.1016/j.molbrainres.2003.09.006.
- Sirois, M. (2015) *Laboratory Animal and Exotic Pet Medicine: Principles and Procedures*. Available at: <https://www.elsevier.com/books/laboratory-animal-and-exotic-pet-medicine/sirois/978-0-323-17299-8> (Accessed: 2 December 2019).
- Stéphanie Bernardet (2015) *Ethique et réglementation en expérimentation animale*.
- Steward, J. P. *et al.* (1968) 'Errors in the technique of intraperitoneal injection of mice.', *Applied microbiology*, 16(9), pp. 1418–1419.
- Suckow, Mark, P. J. D. (2013) *The Laboratory Mouse, Second Edition*. Second, IRE Transactions on Education. Second,. CRC Press. doi: 10.1109/TE.1958.4322019.
- Svendsen, O. (2005) 'Ethics and Animal Welfare Related to in vivo Pharmacology and Toxicology in Laboratory Animals', *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. Blackwell Publishing Ltd, 97(4), pp. 197–199. doi: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto_letter_974.x.
- Sweeting, M. (2015) 'The mouse that roared', *New Electronics*, 48(17), pp. 14–16. doi: 10.2307/2538057.
- Symeon, I. *et al.* (2017) 'Evaluation of the effects of tramadol on analgesic response and locomotor activity on two different strains of laboratory mice', *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. Hellenic Veterinary Medical Society, 68(1), pp. 89–96. doi: 10.12681/jhvms.15567.
- Tapis chauffant thermo régulé 1 ou 2 tapis (rat/souris) | Intellibio* (no date). Available at: <https://www.intelli-bio.com/fr/anesthesie-chirurgie/chirurgie/tapis-chauffant-thermoregule> (Accessed: 6 April 2020).
- Taylor, Reagan; Hayes, Kathryn E.; Toth, L. A. (2000) 'Evaluation of an Anesthetic Regimen for Retroorbital Blood Collec...: Ingenta Connect', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 39(2), pp. 14–17. Available at: <https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/jaalas/2000/00000039/00000002/art00002#> (Accessed: 4 April 2020).
- Thal, S. C. and Plesnila, N. (2007) 'Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO₂ during surgical anesthesia in mice', *Journal of Neuroscience Methods*, 159(2), pp. 261–267. doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.07.016.
- The Jackson Laboratory (no date) *Find & Order Mice*. Available at: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice> (Accessed: 11 April 2020).
- Thomas, J. L. *et al.* (2014) 'Endotracheal intubation in mice via direct laryngoscopy using an otoscope', *Journal of Visualized Experiments*, (86). doi: 10.3791/50269.
- Tokuyama, S. *et al.* (1998) *LACK OF TOLERANCE IN PERIPHERAL OPIOID ANALGESIA IN MICE*, *Life Sciences*.
- TRANQUILLI, Thurmon, G. (2007) *Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia - Google Livres*. Fourth, John Wiley and Sons. Fourth. Edited by Wiley Blackwell. Available at: <https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=j3KpK4Pdgy8C&oi=fnd&pg=PT17&dq=tranquilli+2013+lumb+and+jone%27s+veterinary&ots=0zeqCGGGo8&sig=ykPRdbivnplPvonEfeP7QEZPhOQ#v=onepage&q=tranquilli+2013+lumb+and+jone's+veterinary&f=false> (Accessed: 2 April 2020).
- Université de Laval (2019) *Procédure normalisée de fonctionnement: administrations et injections chez la souris*. Laval. Available at: http://www.caninediabetes.org/pdorg/bd_needle.htm (Accessed: 10 April

2020).

URC- Unité de Recherche Clinique de l'Est parisien (2015) *Lexique - Wash-out*. Available at: <http://urcest.com/lexique/172-wash-out> (Accessed: 5 April 2020).

Uysal, M. *et al.* (2017) 'Caecum location in laboratory rats and mice: An anatomical and radiological study', *Laboratory Animals*, 51(3), pp. 245–255. doi: 10.1177/0023677216658916.

Virtanen, R. (1989) 'Pharmacological profiles of medetomidine and its antagonist, atipamezole.', *Acta veterinaria Scandinavica. Supplementum*, pp. 29–37.

Watanabe, A. *et al.* (2009) 'A simple method for confirming correct endotracheal intubation in mice.', *Laboratory animals*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 43(4), pp. 399–401. doi: 10.1258/la.2009.009008.

What is AAALAC Accreditation? - AAALAC (no date). Available at: <https://www.aaalac.org/accreditation-program/what-is-aaalac-accreditation/> (Accessed: 31 March 2020).

Wikipédia (2020) *Souris*. Available at: <https://fr.wikipedia.org/wiki/Souris> (Accessed: 12 April 2020).

Wixson, S. K. *et al.* (1987) 'The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on arterial blood pH, blood gases, mean arterial blood pressure and heart rate in adult male rats.', *Laboratory animal science*, 37(6), pp. 736–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3125387> (Accessed: 4 April 2020).

Xu, Q. *et al.* (2007) 'Optimizing dosage of ketamine and xylazine in murine echocardiography', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34(5–6), pp. 499–507. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04601.x.

Zurbier, C. J. *et al.* (2014) 'Optimizing anesthetic regimen for surgery in mice through minimization of hemodynamic, metabolic, and inflammatory perturbations', *Experimental Biology and Medicine*, 239(6), pp. 737–746. doi: 10.1177/1535370214524877.

Annexes

Annexe 1 : Saisine de demande d'autorisation de projet

1. Informations Générales

Numéro de version	1
1.1. Référence Dossier	2019052316045018
1.2. Titre du projet	Etude comparative de trois protocoles anesthésiques chez trois souches de souris (C57Bl/6J, Balb/c et Swiss)

1.3. Durée du projet

Nombre d'années	1
Nombre de mois	6
Nombre de jours	0

1.4. Date prévue de début de projet

Dès que le projet est autorisé	Oui
--------------------------------	-----

2. Résumé non technique

Ce projet s'inscrit dans la réalisation de tests d'instillations intra-nasales chez la souris (projet ayant fait l'objet d'une saisine déjà approuvée par le Ministère). Ce geste technique pose deux conditions : une bonne immobilisation de l'animal pour son exécution et le choix d'une anesthésie non gazeuse pour éviter toute interaction avec la substance administrée dans les voies respiratoires de la souris.

C'est pourquoi nous nous proposons de tester 3 protocoles anesthésiques fixes (kétamine/xylazine ; kétamine/médétomidine/atipamézole et propofol/fentanyl) injectés par voie intra-péritonéale afin de comparer le protocole utilisé actuellement (Kétamine/xylazine) à de nouveaux protocoles qui permettraient une anesthésie moins longue tout en garantissant une bonne analgésie, le geste technique étant d'une durée courte (< 5 minutes). L'anesthésie fixe adaptée à ces instillations doit donc être de courte durée et permettre une récupération rapide des animaux en post-anesthésie.

La profondeur et la durée de l'anesthésie seront évaluées par un monitoring respiratoire et des tests réflexes.

Cette étude vise également à comparer les différents protocoles chez 3 souches de souris communément employées en recherche (SWISS, C57Bl6/J et Balb/c); les deux sexes et l'âge des animaux étant également pris en compte. Deux sessions d'expérimentations des mêmes protocoles d'anesthésie seront menées : la première, l'étude pilote, permettra d'adapter le monitoring de l'anesthésie de la seconde, l'étude principale permettra de comparer les différentes méthodes employées.

Quarante-deux animaux au total seront inclus dans le projet.

Ce projet se veut conforme aux principes de Remplacement, de Réduction et de Raffinement. Notre étude fait suite au projet de test d'instillations nasales sur souris qui ne peut pas être remplacé. Quatorze souris de chaque souche dont quatre pour l'étude pilote, seront utilisées pour pouvoir comparer les 2 sexes. Les mêmes animaux seront anesthésiés plusieurs fois pour tester chaque protocole anesthésique afin de limiter le nombre total d'animaux utilisées. Suite à l'expérience, les animaux ne seront pas mis à mort dans le cadre du laboratoire et seront placés. Pour satisfaire leurs besoins vitaux, les animaux seront logés à cinq par cage pour l'étude principale et deux par cage pour l'étude pilote, sexes séparés, avec du matériel d'enrichissement. Enfin, l'acte principal de cette étude reste une anesthésie, acte peu douloureux, les anesthésiques étant injectés par voie intra-péritonéale comme l'état de l'art le prévoit pour ces petits mammifères.

3. Informations Administratives et Réglementaires

3.1. L'Etablissement Utilisateur

Page 2

3.1.1. Agrément de l'Etablissement Utilisateur (EU) où seront utilisés les animaux

Nom de l'Etablissement Utilisateur	UTE IRS-UN
Numéro d'agrément	C44-278
Date de délivrance de l'agrément	17.12.2015
Civilité	Madame/Mademoiselle
NomResponsable	JOLLIET
Prénom du responsable	Pascale
Email du responsable	pascale.jolliet@univ-nantes.fr
Civilité	Monsieur
Nom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU	LIABEUF
Prénom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU	Marie
Email de ce délégataire	marie.liabeuf@univ-nantes.fr

3.1.2. Responsable(s) de la mise en œuvre générale du projet dans l'EU et de sa conformité à l'autorisation de projet

Nombre de responsables _____ 1

Coordonnées du responsable

Civilité	Madame/Mademoiselle
Nom	LIABEUF
Prénom	Marie

Page 3

Adresse Postale

Nom du laboratoire	UTE IRS-UN
Numéro	8
Voie	Quai Moncouso
Code Postal	44007
Ville	Nantes Cedex 01
Email	marie.liabeuf@univ-nantes.fr
Numéro de téléphone	0228080382

3.1.3. Responsable(s) du bien être des animaux

Nombre de responsables _____ 1

Coordonnées du responsable

Civilité	Madame/Mademoiselle
Nom	CHADEUF
Prénom	Gilliane

Adresse Postale

Nom du laboratoire	UMR U1087
Numéro	8
Voie	Quai Moncouso
Code Postal	44007
Ville	Nantes Cedex 01
Email	gilliane.chadeuf@univ-nantes.fr

Page 4

Numéro de téléphone _____ 0228080167

3.2. Le Personnel

Conception des procédures expérimentales et des projets	Oui
Application de procédures expérimentales aux animaux	Oui
Soins aux animaux	Oui
Mise à mort des animaux	Oui

3.3. Le Projet

3.3.1. Objectif du projet

Le projet est-il

Justifié d'un point de vue scientifique _____ Oui

Informations concernant cette(ces) justification(s) _____

Cette étude qui vise à préciser différents protocoles d'anesthésies fixes en termes de durée chez différentes souches de souris entre dans le cadre d'un projet de thèse vétérinaire validé.

3.3.2. Description du projet

Page 5

Le projet s'inscrit dans la recherche d'une anesthésie non gazeuse de courte durée et efficace pour les souris de laboratoire dans le cadre d'instillations nasales (projet déjà notifié par le Ministère). Il consiste à comparer trois protocoles anesthésiques classiques dont le protocole utilisé lors de ces instillations nasales (kétamine/xylazine) [Buitrago, 2008] à de nouveaux protocoles non utilisés actuellement dans le laboratoire : kétamine/médétomidine/atipamézole [Cruz, 1998] et propofol/fentanyl [Alves, 2009] par voie intra-péritonéale (IP). Ces protocoles et les doses des molécules sont issus d'articles scientifiques.

Concernant les durées des anesthésies et les différentes phases qui la composent, elles seront évaluées par des tests de réflexe. Le righting reflex (réflexe de redressement), le pedal withdrawal reflex (réflexe de retrait au pincement des doigts) et le réflexe cutané [Kawai, 2011] permettront d'évaluer toutes les cinq minutes la profondeur des anesthésies, ces réflexes devant disparaître puis réapparaître au cours de la procédure. La fréquence respiratoire permettra de surveiller la stabilité de l'animal durant l'anesthésie.

Trois souches de souris communément utilisées en recherche seront incluses : C57Bl/6J, Balb/c et SWISS. Quarante-deux souris mâles et femelles sont nécessaires pour ce projet.

Ce projet se compose d'une étude pilote et d'une étude principale. L'étude pilote permettra de tester les trois protocoles sur chacune des souches et pour chaque sexe et donc d'ajuster au besoin les doses et techniques de suivi de l'anesthésie pour l'étude principale. Quatre souris par souche (2 mâles et 2 femelles) pour cette étude pilote seront utilisées.

Pour l'étude principale, les animaux seront étudiés à 3 temps différents pour comparer trois âges différents. Dix souris de chaque souche dont cinq mâles et cinq femelles seront anesthésiés à 7, 9 et 10 semaines d'âge. Chaque semaine, tous les animaux seront anesthésiés avec chaque protocole c'est-à-dire 3 fois. Chaque souris recevra donc 4 injections intra-péritonéales par semaine (trois anesthésies dont l'une peut être reversée).

Les animaux seront placés sur un tapis chauffant pour conserver une bonne homéothermie durant toute la durée de l'anesthésie.

Les animaux de ce projet ne seront pas mis à mort et seront proposés à l'adoption.

3.3.3. Précisez, le cas échéant, la (ou les) méthode(s) de mise à mort prévue(s)

S.O.

3.3.4. Précisez, le cas échéant, les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation concernant la méthode de mise à mort envisagée :

S.O.

3.3.5. Stratégie d'expérimentation ou d'observation et approche statistique utilisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'anxiété infligées, et l'impact environnemental, le cas échéant – si une étude statistique est prévue, indiquez

Page 6

et justifiez les tests choisis :

L'usage des mêmes animaux à 3 temps différents et à chaque fois pour les 3 protocoles anesthésiques permettra de réduire le nombre de souris inclus dans cette étude.

Les anesthésiques seront injectés par voie IP, acte simple et peu douloureux quand réalisées selon les bonnes pratiques vétérinaires (aiguilles 26G changées pour chaque animal, injectées dans le cadran inférieur droit de l'animal) et les souris seront positionnées sur tapis chauffants pendant toute la durée de l'anesthésie. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux invariables de 5 avec de l'enrichissement.

Les tests statistiques que nous utiliserons le plus fréquemment seront le test non paramétrique de Mann-Whitney ou paramétrique de Student.

3.4. Les Animaux

3.4.1. Justifiez d'avoir recours à des animaux pour atteindre les objectifs du projet

Tester une anesthésie nécessite une réponse intégrée de l'organisme et n'est donc réalisable que sur animal vivant.

3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés

Souris (*Mus musculus*) Oui

3.4.3. Justifiez la pertinence de l'(des) espèce(s) choisie(s)

Le choix du modèle 'souris' résulte de son grand usage en recherche et est l'espèce cible du laboratoire d'accueil.

3.4.4. S'agit-il de spécimens d'espèces menacées énumérées à l'annexe A du règlement (CE) n° 338/97 du Conseil du 9 décembre 1996 relatif à la protection des espèces de faune et de flore sauvages par le contrôle et leur commerce ? Non

3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ? Non

3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ? Non

3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ? Non

3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le projet :

Animaux tenus en captivité (domestiques ou non domestiques) Oui

Page 7

3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :

Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales appartenant aux espèces dont la liste est fixée réglementairement sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'éleveurs ou de fournisseurs agréés ?

Oui

Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet 1

Etablissement éleveur

Nom de l'établissement Janvier Labs

Adresse postale

Nom du laboratoire Janvier Labs

Complément CS4105

Voie Le Genest Saint Isle

Code Postal 53941

Ville Saint Berthevin

Animaux fournis C57Bl/6J, Swiss, Balb/c

Votre propre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ? Non

Un autre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ? Non

Etablissements éleveurs occasionnels non agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet

Nombre d'établissements 0

Page 8

Etablissements éleveurs ou fournisseurs localisés dans des Etats membres autres que la France fournissant tout ou partie des animaux du projet

Nombre d'établissements 0

Etablissements éleveurs ou fournisseurs localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet

Nombre d'établissements 0

Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent? Non

Animaux utilisés

3.4.10. Nombre d'animaux utilisés dans le projet 42

Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées

12 animaux pour l'étude pilote :

2 mâles et 2 femelles par souche, 3 souches de souris soit 12 animaux

30 animaux pour l'étude principale :

5 mâles et 5 femelles par souche, 3 souches soit 30 animaux

3.4.11. Indiquez à quel(s) stade(s) de développement les animaux seront utilisés et le justifier

Les souris seront des jeunes adultes âgés de 6 à 10 semaines. Ces âges correspondent à ceux utilisés dans les tests d'instillation nasale

3.4.12. Indiquer le sexe des animaux et le justifier

La durée et la profondeur de l'anesthésie varient selon le sexe. 21 mâles et 21 femelles sont donc utilisés dans cette étude afin de comparer les anesthésies selon le sexe des animaux.

3.4.13. Indiquer pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :

Page 9

L'anesthésie générale par voie IP reste un acte peu douloureux et peu invasif. Il n'est pas attendu de douleur ou d'angoisse particulière pour ces animaux. Les points limites qui s'appliqueront seront donc des points limites généraux valables pour tout type d'étude mais non spécifiques (voir annexe).
Aucun signe clinique n'étant attendu dans ce projet, nous appliquerons une grille dite générale. Seules les problématiques de comportement entraînant des lésions cutanées pourront être traitées en fonction de l'état de ces lésions et de l'avis du vétérinaire.
3 signes cliniques notables ou 1 signe clinique sévère entraîneront systématiquement l'euthanasie des animaux concernés.

4. Procédures Expérimentales

4.1. Objet(s) visé(s) par les procédures expérimentales

A - La recherche fondamentale Oui

Description des procédures

Nombre de procédures 2

Procédure

Nom de la procédure

1. Etude pilote : test des protocoles d'anesthésie sur un faible nombre d'animaux et mise en pratique du suivi de la profondeur de l'anesthésie chez 3 souches de souris

Proposition de classification de la procédure selon le degré de sévérité Classe légère

Description détaillée de la procédure expérimentale

Pertinence et justification de la procédure expérimentale

Page 10

Suite à l'injection IP, la perte du righting reflex sera notifiée puis toutes les 5 minutes, les réflexes cutané et de retrait de la patte seront évalués respectivement en effleurant l'animal et en pinçant légèrement l'entre-doigt avec un porte-aiguille. La fréquence respiratoire sera évaluée sur 10 secondes. Les prises de mesure ne commenceront que 5 minutes après l'injection IP afin de laisser les animaux s'endormir le plus calmement possible. Chaque animal sera placé dans une cage individuelle et positionné sur tapis chauffant suite à l'IP. Les différentes phases de l'anesthésie seront donc évaluées suite aux réponses des test de réflexes. Les différents protocoles anesthésiques seront testés une fois par souche et par sexe et seront au besoin modifiés par amendement.

Cette étude pilote permettra d'adapter lors la procédure principale la fréquence des tests des réflexes si besoin, de mieux appréhender la durée et la qualité des anesthésies selon les protocoles et les souches de souris.

Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lot, et les justifier

Six lots de deux animaux : en effet, deux mâles et deux femelles de trois souches différentes seront utilisés pour comparer l'influence du sexe et de la souche sur la qualité de l'anesthésie.

Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés

S.O.

Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médicaments - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires... en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

- Tous les anesthésiques sont injectés par voie intra-péritonéale dans le cadran inférieur droit de l'abdomen en une seule fois avec des aiguilles de 26 G changées à chaque animal. Voici les doses des molécules pour chacun des protocoles : kétamine 80 mg/kg + xylazine 8 mg/kg ; kétamine 75 mg/kg + médétomidine 1 mg/kg + atipamézole 5 mg/kg et propofol 100mg/kg + fentanyl 0,2mg/kg. Chaque animal recevra pour cette étude pilote 4 injections IP au total. Les anesthésies sont espacées de 48 heures minimum (> 7 fois la demi vie des anesthésiques).

- Les volumes d'injection sont de 140 µL/ 10g . Une pesée des animaux est effectuée avant toute anesthésie afin d'avoir un calcul précis des doses administrées.

- Dans le protocole réversible par l'atipamézole, ce dernier sera injecté lors de la réapparition du réflexe cutané ou de retrait de la patte et au plus tard 30 minutes après l'induction de l'anesthésie.

- Concernant les conditions d'hébergement des rongeurs, ils sont répartis en fonction du sexe et de la souche soit 6 cages de 2 animaux. Un enrichissement est ajouté dans leur milieu de vie.

Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Les souris seront surveillées quotidiennement

Page 11

Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :
S.O

Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :
S.O

Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale

Placement ou mise en liberté des animaux Oui

Précisez les animaux concernés

Tous les animaux seront placés après avis vétérinaire

Procédure

Nom de la procédure

2. Eude principale : Etude comparative de trois protocoles anesthésiques fixes sur trois souches de souris

Proposition de classification de la procédure selon le degré de sévérité Classe légère

Description détaillée de la procédure expérimentale

Pertinence et justification de la procédure expérimentale

Suite à l'injection IP, le righting reflex sera notifié puis toutes les 5 minutes, les réflexes cutané et de retrait de la patte seront évalués respectivement en effleurant l'animal et en pinçant légèrement l'entre-doigt avec un porte-aiguille. La fréquence respiratoire sera évaluée sur 10 secondes. Les différentes phases de l'anesthésie seront évaluées suite aux réponses des tests de réflexes. Cette procédure sera amendée au besoin en fonction des résultats de l'étude pilote.

Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lot, et les justifier

Six lots de cinq animaux : en effet, mâles et femelles de trois souches différentes seront utilisés pour comparer l'influence du sexe sur la qualité de l'anesthésie.

Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés

S.O.

Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médicaments - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y

Page 12

compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

- Tous les anesthésiques sont injectés par voie intra-péritonéale dans le cadran inférieur droit de l'abdomen en une seule fois avec des aiguilles de 26 G changées à chaque animal. Voici les doses des molécules pour chacun des protocoles : kétamine 80 mg/kg + xylazine 8 mg/kg ; kétamine 75 mg/kg + médétomidine 1 mg/kg + atipamézole 5 mg/kg et propofol 100mg/kg + fentanyl 0,2mg/kg. Chaque animal recevra pour cette étude 12 injections IP au total. Les anesthésies sont espacées de 48 heures minimum.

-Les volumes d'injection seront de 140 µL/ 10g. Une pesée des animaux est effectuée avant toute anesthésie. Chaque animal recevra pour cette étude étude pilote 4 injections IP au total. Les anesthésies sont espacées de 48 heures minimum (> 7 fois la demi vie des anesthésiques).

- Dans le protocole réversible par l'atipamézole, ce dernier sera injecté lors de la réapparition du réflexe cutané ou de retrait de la patte et au plus tard 30 minutes après l'induction de l'anesthésie.

-Concernant les conditions d'hébergement des rongeurs, ils sont répartis en fonction du sexe et de la souche soit 6 cages de 5 animaux. Un enrichissement est ajouté dans leur milieu de vie.

Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Les souris seront surveillées quotidiennement

Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

S.O

Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

S.O

Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale

Placement ou mise en liberté des animaux Oui

Précisez les animaux concernés

Tous les animaux seront placés après avis vétérinaire

Page 13

Annexe 2 : Critères cliniques démontrant une atteinte sévère de l'animal pouvant justifier une euthanasie accompagnant la demande d'autorisation de projet

Signes cliniques notables	Signes cliniques sévères
En présence de 3 signes prévenir le responsable du SBEA et le responsable de l'étude ou son suppléant	En présence d' un seul signe prévenir le responsable du SBEA et le responsable de l'étude ou son suppléant
Plaie/ traumatisme	
Lésion sans effraction cutanée Masse	Lésion sévère (automutilation, plaie suintante, masse ulcérée...) Traumatisme (fracture), saignement incontrôlable Mauvaise tolérance locale (iv ou sc), lésion étendue et/ou difficulté/impossibilité de faire le traitement
Comportement / Mouvement	
Agitation/agressivité Vocalisation anormale Hypomotilité Hyporéactivité Isolement Incoordination modérée Résistance lors du traitement et/ou à la manipulation Tourner en rond (stéréotypie)	Difficulté/impossibilité de mouvement Cris persistants Décubitus Incoordination marquée Tremblements généralisés Convulsions
Respiration	
Respiration accélérée/ralentie	Respiration bruyante Respiration difficile Suffocation
Aspect général	
Poil sale Coloration anormale de la peau Pâleur des muqueuses Coloration autour du museau Flaccidité musculaire généralisée Gonflement abdominal Zone urogénitale souillée	Persistance du pli cutané Coloration jaune ou bleue des muqueuses Voussure du dos/Dos cambré Froid au toucher
Œil	
Larmes rouges (chromodacryorrhée) Paupières closes ou mi closes Larmolement/écoulement	Plaie de l'œil
Excrétion	
Fèces liquides Fèces mucoïdes	Absence de fèces Fèces rouges/ fèces noires Urine rouge
Reproduction	
Écoulement génital	Dépôts et/ou restes de fœtus dans la cage
Evolution pondérale	
Perte de poids <10%	Perte de poids >10%*
Consommation de nourriture	
Diminution/absence de prise de nourriture	Absence de prise de nourriture (+ de 2 jours)
Température	
Hypothermie Hyperthermie	Hypothermie <35.5°C Hyperthermie >40.5°C

Aucun signe clinique n'étant attendu dans ce projet, nous appliquerons une grille dite générale. Seules les problématiques de comportement entraînant des lésions cutanées pourront être traitées en fonction de l'état de ces lésions et de l'avis du vétérinaire.

3 signes cliniques notables ou 1 signe clinique sévère entrainera systématiquement l'euthanasie des animaux concernés.

Annexe 3 : Avis du Comité d’Ethique suite au formulaire de demande de projet

Protocole CEEA PdL projet APAFIS 20770 : Etude comparative de trois protocoles anesthésiques chez trois souches de souris (C57Bl/6J, Balb/c et Swiss).

Angers, le 12 juin 2019.

Bonjour,

Veillez trouver ci-dessous un résumé des commentaires et avis de différents membres du Comité d’Ethique en Expérimentation Animale des Pays-de-la-Loire.

Si vous souhaitez un avis “favorable” merci de répondre le plus précisément possible aux différents avis/questions ci-dessous.

Enfin, le Comité ne peut pas se prononcer officiellement sur des protocoles expérimentaux qui ont commencé avant d’avoir obtenu un avis “favorable”. Donc, veuillez indiquer clairement que les protocoles n’ont pas commencé, ou s’ils ont débuté, comment les avis et remarques seront pris en considération dans la poursuite de vos travaux.

Bien cordialement,
Catherine Montembault

Projet APAFIS 20770 : Etude comparative de trois protocoles anesthésiques chez trois souches de souris (C57Bl/6J, Balb/c et Swiss).

Marie Liabeuf.

1/ Préciser le type d'enrichissement des animaux

2/ Préciser la période d'acclimatation des animaux avant intervention.

3- Après lecture attentive de cette DAP, pas de problème éthique. Le suivi de la douleur est bien pris en compte et les animaux seront replacés en fin d’étude.

Juste une remarque sur le fond : cette étude paraît superficielle, et il aurait été intéressant d’y associer plusieurs paramètres biologiques pendant et à distance des anesthésies pour que ce travail soit vraiment une référence dans le domaine.

Annexe 4 : Autorisation de projet délivré par le MESRI



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR, DE LA RECHERCHE ET
DE L'INNOVATION

Paris, le 3 juillet 2019

Objet : Notification de décision relative à l'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

Direction générale de la recherche et de l'innovation

Service de la performance, du financement et de la contractualisation avec les organismes de recherche

Département des pratiques de recherche réglementées

Cellule Animaux utilisés à des fins scientifiques - AFIS

Affaire suivie par
Véronique Delassault
Responsable administrative de la cellule AFIS

Tél: 0155559727
veronique.delassault@recherche.gouv.fr

autorisation-projet@recherche.gouv.fr

1 rue Descartes
75231 Paris Cedex 05

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126, le projet:

référéncé sous le numéro APAFIS#20770-2019052316045018 v3
ayant pour titre : Etude comparative de trois protocoles anesthésiques chez trois souches de souris (C57B1/6J, Balb/c et Swiss)
déposé par l'établissement utilisateur : Animalerie UTE IRS-UN, numéro d'agrément C44278, dont la responsable est Madame Pascale JOLLIET,
et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation est assurée par : Madame Marie LIABEUF,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée, sous réserve de la validité de l'agrément de l'établissement utilisateur, pour une durée de 1 an à compter de la présente notification.

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le comité d'éthique en expérimentation animale n°006 et a reçu un avis favorable.

Ce projet ne fera pas l'objet, à l'issue de sa réalisation, d'une appréciation rétrospective.

Pour la ministre et par délégation l'adjoint au chef du service de la performance, du financement et de la contractualisation avec les organismes de recherche.



Damien ROUSSET

Vu : L'enseignant Rapporteur

De l'Ecole Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation
Oniris

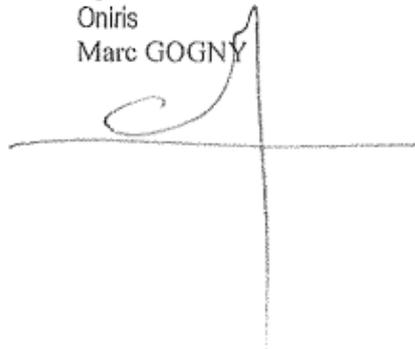
Jean-Claude DESFONTIS



Vu : Le Directeur Général

par interim
De l'Ecole Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation
Oniris

Marc GOGNY



Nantes, le 21/11/2020

Vu :

Le Président de la Thèse

Professeur Bertrand ROZEC

Professeur Bertrand ROZEC
Chef de service Anesthésie Réanimation
Coordonnateur Inter régional DES AR
Hôpital Nord Laënnec - bd Jacques Monod
44 800 Saint Herblain
02.40.16.52.93



Vu :

Le Doyen de la Faculté de
Médecine de Nantes

Professeur Pascale JOLLIET

Vu et permis d'imprimer

NOM : BOUR
Prénom : Audrey

ETUDE COMPARATIVE DE 3 PROTOCOLES ANESTHESIQUES KETAMINE/XYLAZINE ; KETAMINE/MEDETOMIDINE/ATIPAMEZOLE ET PROPOFOL/FENTANYL SUR 3 SOUCHES DE SOURIS DE LABORATOIRE SWISS, BALB/C ET C57BL/6J

Résumé

La souris est l'espèce la plus utilisée en expérimentation animale en France avec 60% de l'effectif total d'animaux d'expérience. De nombreux projets pour la mise en place de médicaments humains passent par des modèles murins. Dans le cadre d'une étude sur l'asthme allergique où les souris sont sensibilisées par voie intra-nasale et cutanée (souris femelles souche Balb/c âgées de 6 semaines) afin d'étudier la réponse immunitaire et le remodelage bronchique associés à l'instillation de *Dermatophagoides farinae* sous anesthésie générale. Plusieurs protocoles anesthésiques ont été testés avec plus ou moins de succès.

Notre étude s'inscrit dans la recherche d'un protocole anesthésique de courte durée ayant un impact faible sur le rythme biologique des souris. Pour ce faire, trois protocoles anesthésiques (kétamine/ xylazine ; kétamine/médétomidine/atipamézole et propofol/fentanyl) différents ont été testés sur trois souches de souris communément utilisées en expérimentation animale (Balb/c, SWISS et C57BL/6J). L'administration des produits anesthésiques est réalisée par voie intra-péritonéale. Pour chaque souche, 5 souris de sexe mâle et femelle ont subi 9 anesthésies. Le monitoring des anesthésies s'est axé sur la fréquence respiratoire et le relevé de divers réflexes. Le temps d'induction et la durée de chaque anesthésie ont été relevés. L'impact anesthésique est évalué par des pesées régulières.

La durée d'une anesthésie et le temps d'induction varient selon plusieurs facteurs : le protocole anesthésique, la souche de la souris et le sexe. Aucun de ces 3 protocoles ne semble permettre une anesthésie chirurgicale. Malgré des anesthésies répétées, les animaux ont poursuivi leur croissance correctement.

Tout protocole anesthésique doit donc être réfléchi selon la souche et le sexe des souris impliquées dans l'étude car ces facteurs peuvent avoir un impact dans les résultats de l'étude. Le bien-être des animaux pendant l'anesthésie et au réveil doit également être pris en compte.

MOTS CLES : souris, expérimentation animale, modèle animal, anesthésie, protocole anesthésique, monitoring médical, sexe, fréquence respiratoire, kétamine, xylazine, propofol, fentanyl, médétomidine, atipamézole, administration intra-péritonéale

Jury

Président : Monsieur Bertrand Rozec

Rapporteur : Monsieur Jean-Claude Desfontis

Assesseur : Madame Gwenola Touzot-Jourde

Adresse de l'auteur :

Audrey Bour

2 avenue de l'Aiguillon

44 980 Sainte Luce sur Loire