

# SOMMAIRE

SOMMAIRE .....	1
PREMIERE PARTIE .....	7
L'EUTHANASIE DES ANIMAUX .....	7
DE LABORATOIRE : DES TECHNIQUES CONTROVERSEES .....	7
I. Généralités concernant l'euthanasie des animaux de laboratoire .....	9
I.1. Le contexte réglementaire .....	9
I.2. Les recommandations européennes .....	9
I.3. Les justifications de l'euthanasie .....	10
I.4. Les critères d'acceptabilité .....	10
I.5. Les critères de choix d'une technique d'euthanasie .....	12
II. Principales méthodes d'euthanasie .....	13
II.1. Principales méthodes acceptables d'après les recommandations européennes (23) .....	14
II.1.1. Les méthodes physiques .....	14
II.1.1.1. Les méthodes physiques sur des animaux conscients .....	14
II.1.1.1.1. Pistolet à cheville percutante .....	14
II.1.1.1.2. Commotion .....	14
II.1.1.1.3. Electrocutation .....	14
II.1.1.1.4. Dislocation cervicale .....	14
II.1.1.1.5. Décapitation .....	15
II.1.1.1.6. Micro-ondes .....	15
II.1.1.2. Les méthodes physiques sur des animaux inconscients .....	15
II.1.1.2.1. Congélation .....	15
II.1.1.2.2. Exsanguination .....	15
II.1.1.2.3. Décérébration .....	15
II.1.2. Les méthodes chimiques .....	16
II.1.2.1. Méthodes chimiques par inhalation .....	16
II.1.2.1.1. Les méthodes chimiques par inhalation sur des animaux conscients .....	16
II.1.2.1.1.1. Dioxyde de carbone .....	16
II.1.2.1.1.2. Monoxyde de carbone .....	16
II.1.2.1.1.3. Surdosage d'anesthésique volatil .....	16
II.1.2.1.2. Les méthodes chimiques par inhalation sur des animaux inconscients .....	17
II.1.2.2. Les méthodes chimiques par injection .....	17
II.1.2.2.1. Les méthodes chimiques par injection sur des animaux conscients .....	17
II.1.2.2.2. Les méthodes chimiques par injection sur des animaux inconscients .....	17
II.1.2.2.2.1. T61 .....	17
II.1.2.2.2.2. KCl .....	18
II.1.2.2.2.3. Hydrate de chloral .....	18
II.1.2.3. Méthodes pour les animaux aquatiques .....	18
II.1.2.3.1. Benzocaïne .....	18
II.1.2.3.2. MS-222 (Tricaïne méthane sulfonate) .....	18
II.1.2.3.3. Etomidate et métomidate .....	18
II.1.2.3.4. Quinaldine .....	18
II.2. Complément d'information pour l'euthanasie des fœtus de rongeur ou des nouveau-nés .....	19
III. Etude bibliographique des principales techniques d'euthanasie controversées .....	20
III.1. Euthanasie par décapitation .....	20
III.1.1. Le Débat .....	20
III.1.2. Les différentes recommandations .....	22
III.1.2.1. Les recommandations des Etats-Unis .....	22

III.1.2.2. Les recommandations canadiennes .....	22
III.1.2.3. Les recommandations européennes.....	22
III.1.3. Impact biologique de la décapitation comme technique d'euthanasie.....	22
III.1.4. Influence d'une anesthésie préalable à la décapitation .....	23
III.2. Euthanasie par dislocation cervicale .....	25
III.3. Euthanasie au dioxyde de carbone .....	27
III.3.1. Généralités sur l'euthanasie par inhalation de gaz .....	27
III.3.2. Mécanisme d'action du CO <sub>2</sub> .....	28
III.3.3. Controverse autour de l'utilisation du CO <sub>2</sub> .....	28
III.3.3.1. Les causes de la controverse .....	28
III.3.3.1.1. Formation d'acide carbonique au niveau des membranes oculaires, nasales, buccales et du tractus respiratoire.....	28
III.3.3.1.2. Activation de nocicepteurs chez le rat anesthésié .....	28
III.3.3.1.3. Observations comportementales de signes de douleur.....	29
III.3.3.1.4. Lésions histologiques .....	29
III.3.3.1.5. Aversion vis à vis du CO <sub>2</sub> .....	29
III.3.3.1.6. Evaluation du temps nécessaire à la perte de conscience.....	30
III.3.3.1.7. Etudes réalisées chez l'Homme.....	32
III.3.3.2. Les tentatives d'amélioration de la technique .....	33
III.3.3.2.1. Chambre pré remplie versus remplissage progressif.....	33
III.3.3.2.2. Mélange Oxygène et Dioxyde de Carbone .....	35
III.3.3.2.3. Réalisation préalable d'une anesthésie ou d'une sédation .....	36
III.3.3.2.4. Autres facteurs.....	36
III.3.3.3. Les solutions de remplacement .....	37
III.3.3.4. Le meeting de Newcastle sur l'euthanasie par l'anhydride carbonique des animaux de laboratoire du 27 au 28 février 2006 (29).....	41
III.3.3.4.1. Objectifs .....	41
III.3.3.4.2. Conclusions .....	41
III.3.3.4.2.1. Les problèmes .....	41
III.3.3.4.2.2. Les bonnes pratiques d'utilisation.....	41
III.3.3.4.2.3. Les méthodes alternatives utilisant des agents gazeux.....	41
III.3.3.4.2.4. Recherches futures .....	42
III.3.3.5. Les avantages, inconvénients de la technique au CO <sub>2</sub> et recommandations du rapport de l'AVMA de juillet 2007 (5).....	42
III.3.3.5.1. Les avantages .....	42
III.3.3.5.2. Les inconvénients.....	42
III.3.3.5.3. Les recommandations.....	42
DEUXIEME PARTIE : .....	45
OPTIMISATION DE LA TECHNIQUE D'EUTHANASIE PAR INHALATION.....	45
DE CO <sub>2</sub> DANS UN CENTRE DE RECHERCHE PHARMACOLOGIQUE.....	45
I. Pratique de l'euthanasie par inhalation de CO <sub>2</sub> à l'IdRS .....	47
I.1. Etat des lieux.....	47
I.1.1. Guéridon mobile MC2003 V03 Minerve®.....	47
I.1.2. Appareils « maison » .....	48
I.2. Etude de nouveaux appareils .....	49
I.2.1. Guéridon mobile MC2003 (nouvelle version) Minerve® .....	49
I.2.2. Appareil TEM .....	50
I.3. Conclusion .....	52
II. Partie expérimentale .....	53
II.1. Objectif.....	53
II.2. Tests préliminaires.....	53
II.2.1. Objectifs.....	53

II.2.2.Méthodes .....	53
II.2.3.Résultats.....	53
II.3. Matériel et méthode .....	54
II.3.1. Matériel.....	54
II.3.2. Animaux .....	55
II.3.2.1. Expérience n°1 .....	55
II.3.2.2. Expérience n°2.....	55
II.3.2.3. Expérience n°3.....	56
II.3.3. Méthode .....	56
II.3.3.1. Procédure .....	56
II.3.3.2. Paramètres d'intérêt.....	57
II.3.4. Statistiques.....	57
II.4. Résultats.....	60
II.4.1. Expérience n°1.....	60
II.4.2. Expérience n°2.....	64
II.4.3. Expérience n°2 versus expérience n°1 .....	66
II.4.4. Expérience n°3.....	67
II.4.5. Expérience n°3 versus expérience n°1 .....	69
II.4.6. Observations supplémentaires .....	70
II.5. Interprétation .....	71
II.6. Conclusion .....	72
II.7. Etude préliminaire rat .....	73
II.7.1. Objectif.....	73
II.7.2. Matériel et méthode .....	73
II.7.2.1. Matériel.....	73
II.7.2.2. Animaux .....	73
II.7.2.3. Méthode.....	73
II.7.2.4. Statistiques.....	73
II.7.3. Résultats.....	74
II.7.4. Interprétation et conclusion .....	74
CONCLUSION .....	75
BIBLIOGRAPHIE .....	77



# INTRODUCTION

Dans le cadre de la recherche pharmaceutique, malgré le développement de méthodes alternatives, le recours à l'animal de laboratoire reste une nécessité. Il convient néanmoins de s'interroger sur la manière de limiter ce recours et, le cas échéant, d'améliorer au maximum les conditions de réalisation des expérimentations.

Lors de la rédaction d'un protocole expérimental, le devenir des animaux en fin de manipulation doit être défini et le plus souvent ces animaux doivent être euthanasiés. En expérimentation animale, l'euthanasie est une nécessité ; ses justifications peuvent être très diverses mais doivent toujours respecter l'éthique professionnelle et les réglementations spécifiques. Le mot euthanasie vient des termes grecs « eu » qui signifie bon et « thanatos » qui signifie mort. L'euthanasie se doit donc d'être une mort causant le moins possible de douleur et de détresse. De plus, en fonction de la technique choisie, l'impact de celle-ci sur les variables mesurées ainsi que son éventuelle interférence avec l'interprétation des données de recherche doivent être prises en compte.

C'est dans une optique d'amélioration des expérimentations que sera abordé le sujet de l'euthanasie des animaux de laboratoire et plus particulièrement celui de l'euthanasie au CO<sub>2</sub>, technique soumise à controverse.

Dans une première partie bibliographique, l'euthanasie sera replacée dans un cadre réglementaire, les techniques d'euthanasie des animaux de laboratoire seront présentées ainsi que les principales techniques soumises à controverse : la décapitation et la dislocation sur animal vigile et l'euthanasie au CO<sub>2</sub> seront étudiées en détail.

Dans la deuxième partie, la pratique de l'euthanasie au CO<sub>2</sub> dans un centre de recherche pharmacologique sera détaillée puis une partie expérimentale, visant à évaluer les possibilités d'amélioration de cette technique (limitation des risques de souffrance chez l'animal) sera développée.



Rapport-Gratuit.com

## **PREMIERE PARTIE**

### **L'EUTHANASIE DES ANIMAUX DE LABORATOIRE : DES TECHNIQUES CONTROVERSEES**



# I. Généralités concernant l'euthanasie des animaux de laboratoire

L'euthanasie des animaux de laboratoire s'inscrit dans un cadre réglementaire défini : directive européenne 86-609 (18), transcrite en droit français par le décret du 19 Octobre 1987(21) ; il existe de plus des recommandations européennes : il s'agit des recommandations de la commission européenne de la DGXI de 1996 et 1997, détaillant les critères d'acceptabilité communs à toutes les techniques ainsi que les différentes techniques préconisées (23, 24).

## I.1. Le contexte réglementaire

Dans le décret 87-848 du 19 Octobre 1987, il est fait référence à l'euthanasie dans ces termes : « Tout animal qui risque de souffrir ou qui aurait subi des dommages irréversibles ou durables doit être sacrifié immédiatement selon des méthodes humaines. » (21)

## I.2. Les recommandations européennes

Dans l'annexe A révisée de la convention STE 123 (18), il est écrit :

-« Toute méthode de sacrifice des animaux exige des connaissances qui ne peuvent être acquises que par une formation appropriée. Les animaux devraient être sacrifiés en utilisant des méthodes respectant les principes préconisés dans les recommandations de la commission européenne de la DGXI de 1996 et 1997 sur l'euthanasie des animaux de laboratoire (partie 1 et 2) ». Ces recommandations seront détaillées ultérieurement.

-« Tout animal profondément inconscient peut être saigné, mais des médicaments qui paralysent les muscles avant la perte de conscience, ceux ayant les effets du curare, et l'électrocution sans passage de courant à travers le cerveau ne devraient pas être utilisés sans anesthésie préalable.

Il ne devrait pas être procédé à l'élimination du corps de l'animal avant que la mort ait été confirmée. »

D'autres lignes directrices concernant l'euthanasie des animaux de laboratoire existent (*cf.* tableau 1). Ces différentes lignes directrices sont en général fortement influencées par celles de l'American Veterinary Medical Association (AVMA) (2, 3, 4, 5) et se recoupent le plus souvent mais il arrive que ces recommandations diffèrent pour certaines techniques, notamment l'euthanasie au CO<sub>2</sub>.

**Tableau 1 : Différentes lignes directrices (non européennes) concernant l'euthanasie des animaux de laboratoire.**

Pays	Texte	Organisme	Date
Etats-unis (55)	Report on euthanasia of unwanted, injured or diseased animals for education or scientific purposes	UFAW	1986
Etats-Unis (5)	Report of the AVMA Panel on Euthanasia	AVMA	Révisé en 2007
Canada (12)	Guide to the Care of Experimental Animals	CCAC	1993
Australie Nouvelle-Zélande (7)	Euthanasia of Animals Used for Scientific Purposes	ANZCCARCT	2001
Royaume-Uni (31)	Code of Practice for the Humane Killing of Animals under Schedule 1 to the Animals (Scientific procedures) Act 1986	Home Office	Révisé en 1997

### **I.3. Les justifications de l'euthanasie**

Les justifications de l'euthanasie peuvent être très diverses :

- La principale raison est souvent partie intégrante du protocole expérimental : réalisation d'une autopsie, prélèvement de tissus, d'organes vitaux, chirurgie rendant un réveil impossible, fin d'un protocole...

D'autres motifs peuvent être (23) :

- Un animal qui présente des « end-points » : critères cliniques, physiques et comportementaux suggérant que l'animal pourrait présenter un degré de souffrance élevé. Ces « end-points » sont des limites expérimentales prédéfinies par le chercheur ;
- Un animal infecté par un microorganisme pathogène pour l'homme ou par un microorganisme génétiquement modifié (des précautions spéciales peuvent alors être nécessaires lors de l'élimination des cadavres.) ;
- Des animaux très âgés ou présentant un trouble comportemental (agressivité...) ;
- Un animal accidenté ou spontanément malade, ce qui est de plus en plus rare compte-tenu des conditions sanitaires actuelles ;
- Des animaux non utilisés : surplus d'élevage, stock de laboratoire devenu inutilisable (sexe, âge, poids...). Ce cas devrait être évité par une gestion raisonnée de l'utilisation des animaux.

### **I.4. Les critères d'acceptabilité**

Les critères rendant une euthanasie acceptable en expérimentation animale sont les suivants :

- La mort doit survenir sans signe de panique, de douleur ou de détresse ;
- La perte de conscience doit apparaître dans les plus brefs délais ;
- La méthode doit être irréversible et reproductible ;
- Elle doit être conforme aux exigences et au but de l'étude ;
- La sécurité du personnel doit être assurée et la méthode choisie doit avoir un impact minimum sur le milieu et sur l'écologie ;
- L'euthanasie doit produire un minimum d'effets émotionnels sur l'observateur et sur le personnel qui effectue l'euthanasie ;
- Le lieu où se pratique l'euthanasie doit être séparé des locaux d'hébergement des animaux ;
- Si la méthode est compatible avec l'expérience, elle doit être la moins invasive possible, peu coûteuse et requérir relativement peu d'entretien au niveau du matériel (23).

Ces objectifs peuvent être reformulés en critères :

- Humanitaire

Toute réaction de frayeur, d'angoisse ou de douleur de l'animal doit être évitée.

- D'efficacité

La technique doit causer une perte de conscience rapide suivie d'une mort rapide. La mort doit être provoquée sans douleur. La technique doit être fiable (reproductible, sûre) et irréversible.

- De pertinence

La technique d'euthanasie doit être choisie en fonction de l'espèce mais aussi de l'étude, des effets étudiés, de la technique d'évaluation mise en jeu. Elle ne doit pas modifier les paramètres étudiés, les tissus prélevés.

➤ De faisabilité

La méthode doit être économique. Le produit utilisé doit être facilement disponible.

➤ « Esthétique » ou « Emotionnel »

La méthode doit provoquer le moins possible de répulsion chez l'opérateur ou chez l'observateur extérieur.

➤ De sûreté

La méthode ne doit pas mettre en danger la santé du personnel. Le personnel doit être formé et entraîné. La méthode ne doit également pas entraîner de danger pour l'environnement : pollution, explosion, incendie...

Elle doit entrer dans un cadre légal : législation sur les stupéfiants, code du travail (49)...

Au vu de ces critères il paraît important de définir ce que l'on entend par douleur. De plus, par la suite, il sera fait référence aux notions de détresse ou encore de souffrance et de nociception chez l'animal ces termes seront donc également définis.

La **douleur** a été définie pour l'homme en 1979 par l'Association Internationale pour l'Etude la Douleur (IASP) comme étant : « une expérience sensorielle ou émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire, réelle ou potentielle ou décrite en des termes évoquant une telle lésion. »

Il est important de noter qu'il est fait référence au langage par le terme « décrite » : cette définition est donc difficilement applicable à l'animal.

Une définition complétée a été donnée pour l'animal en 1997 par Molony et Kent : « expérience sensorielle et émotionnelle aversive, représentée par la « conscience » que l'animal a de la rupture ou de la menace de rupture de l'intégrité de ses tissus ».

La douleur de l'animal est donc une expérience aversive qui déclenche des réactions motrices de protection et entraîne des réactions d'évitement apprises qui modifient les caractéristiques du comportement, en particulier les interactions sociales.

Il convient de bien différencier le terme de douleur de celui de **nociception** : la nociception est « une modalité sensorielle mise en jeu par tout stimulus capable de produire une lésion tissulaire » ; La nociception est l'expérience sensorielle élémentaire, la notion de douleur ajoute l'expérience émotionnelle. La douleur est donc plus difficile à évaluer car elle inclut la notion de conscience et suppose donc la participation de centres intégrateurs sensori-moteurs et de populations neuronales compétentes dans le traitement des informations à caractère émotionnel.

La **souffrance** est définie pour l'homme comme étant un état émotionnel de « détresse » associé aux événements qui menacent l'intégrité biologique ou psychologique de l'individu (IASP). La souffrance est très souvent accompagnée de douleur mais ce n'est pas forcément toujours le cas, une souffrance peut n'être que psychologique. La douleur et la souffrance sont phénoménologiquement distinctes.

Enfin en expérimentation animale on s'intéresse souvent à la **détresse** éprouvée par l'animal. Ce terme est souvent employé pour désigner un stress psychologique ou encore une tension psychique, pression, contrainte ou agression. La détresse implique une causalité externe souvent temporaire et de grande intensité physique ou psychique.

(51)

## I.5. Les critères de choix d'une technique d'euthanasie

Plusieurs facteurs vont intervenir dans le choix de la technique d'euthanasie.

- L'**espèce animale** : en fonction de celle-ci toutes les techniques ne seront pas applicables.
- Le **nombre** d'animaux à euthanasier : un groupe ou un seul individu ne seront pas sacrifiés par la même méthode. Il faudra prendre en compte la disponibilité du personnel mais aussi le coût de la technique et les installations à disposition.
- Le **motif** de l'euthanasie : la technique différera selon que l'animal sera euthanasié afin de réaliser des examens *post-mortem* ou non et en fonction des examens à réaliser.
- L'**état de l'animal** au moment de la réalisation de l'euthanasie ; par exemple : l'animal est-il anesthésié ou non ? S'il est anesthésié on pourra faire immédiatement une exsanguination.
- Enfin il faudra considérer le **personnel** : sa formation, l'effectif disponible, sa « sensibilité », certaines personnes ne voudront pas utiliser certaines techniques peu « esthétiques » comme la décapitation (49).

En fonction de ces différents critères, il convient de choisir la technique la plus adaptée parmi le large panel des méthodes répertoriées dans les recommandations émises par la commission européenne (23).

## II. Principales méthodes d'euthanasie

Les méthodes d'euthanasie préconisées en Europe sont regroupées dans les recommandations de la commission européenne de la DGXI de 1996 et 1997 sur l'euthanasie des animaux de laboratoire (partie 1 et 2) (23, 24). Elles sont fortement influencées par les méthodes recommandées par l'AVMA (1993) (4) et le Canadian Council on Animal Care (CCAC) (1993) (12). Elles regroupent les différentes méthodes d'euthanasie classées en trois catégories :

### ➤ Les méthodes acceptables

Ces méthodes comprennent :

#### ❖ Les méthodes physiques

Assommement, commotion, électrocution, dislocation cervicale, décapitation, micro-ondes.

#### ❖ Les méthodes chimiques

*Par inhalation* : Dioxyde de carbone, monoxyde de carbone, surdosage d'anesthésique volatil.

*Par injection* : Barbituriques, T61.

*Pour les animaux aquatiques* : Benzocaïne, MS-222 (Tricaïne méthane sulfonate), étomidate et métomidate, quinaldine.

### ➤ Les méthodes acceptables pour les animaux inconscients

Ces méthodes comprennent :

Décérébration, congélation, exsanguination, azote/argon, éthanol, hydrate de chloral, KCl, embolisation gazeuse.

Pour toutes ces méthodes, la mort peut être obtenue selon trois mécanismes différents qui peuvent être concomitants ou non :

- Hypoxie directe ou indirecte ;
- Dépression de l'activité neuronale nécessaire aux fonctions vitales ;
- Destruction physique des structures cérébrales.

### ➤ Les méthodes inacceptables

Ces méthodes comprennent :

Décompression/vide, hypothermie, hyperthermie, noyade/ retrait de l'eau pour les vertébrés aquatiques, écrasement du cou, étranglement, NO, cyclopropane, éther, chloroforme, méthoxyflurane, trichloréthylène, HCN, 2-Phénoxyéthanol, uréthane, agents bloquant la plaque neuromusculaire, kétamine, sédatifs, sulfate de magnésium, narcotiques opiacés, administration de substance dans l'eau de boisson.

## **II.1. Principales méthodes acceptables d'après les recommandations européennes (23)**

### **II.1.1. Les méthodes physiques**

Elles présentent l'avantage de recueillir des tissus sans contamination chimique, d'être plus rapides que les méthodes chimiques. Par contre elles exigent une grande habileté du manipulateur, une bonne formation et un entraînement et elles peuvent être psychologiquement désagréables.

#### **II.1.1.1. Les méthodes physiques sur des animaux conscients**

##### *II.1.1.1.1. Pistolet à cheville percutante*

Il est surtout utilisé pour de gros animaux. Chez les gros cochons, il est inefficace du fait de l'épaisseur et de la densité de leur crâne. L'exsanguination est effectuée juste après. La position du pistolet est très importante et diffère selon les espèces c'est pourquoi les manipulateurs doivent être entraînés.

##### *II.1.1.1.2. Commotion*

Chez les petits animaux comme les petits lapins, les chatons et chiots nouveau-nés, les rats, les souris, les jeunes cobayes, les hamsters, les oiseaux, les reptiles, amphibiens et poissons, un coup peut suffire. Pour les grosses espèces, un pistolet non perforant peut-être utilisé. Une exsanguination doit être pratiquée juste après. En Suisse un jet d'eau à haute pression peut être utilisé pour les cochons.

##### *II.1.1.1.3. Electrocutation*

Cette méthode, peu utilisée, peut être réalisée sur des poissons, des amphibiens, des oiseaux, des chiens et autres carnivores, des volailles et des cochons. Elle peut être plus difficile à réaliser chez les animaux à corne. Le courant doit nécessairement passer en premier par le cerveau pour anesthésier l'animal puis éventuellement par le cœur pour le tuer (voltage beaucoup plus élevé). Elle doit le plus souvent être associée à une méthode plus sûre (exsanguination par exemple).

##### *II.1.1.1.4. Dislocation cervicale*

Les espèces concernées sont les poissons, les oiseaux, les souris, les jeunes rats et cobayes, les lapins en période néonatale, les rats et lapins adultes en dessous de 1kg. Cette méthode, si elle est bien réalisée, cause une perte de conscience instantanée. Elle présente en revanche le désavantage d'être peu esthétique et donc de causer un stress chez l'expérimentateur. Les animaux devraient, si possible, être préalablement sédatés ou anesthésiés. La mort doit être confirmée par exsanguination ou destruction des structures cérébrales. Cette méthode ne provoque pas une perte de conscience immédiate chez la volaille.

#### *II.1.1.1.5. Décapitation*

Les espèces concernées sont les poissons, les amphibiens, les rongeurs et les petits lapins.

Cette méthode devrait de préférence être réalisée avec une guillotine prévue à cet effet ; les ciseaux peuvent être utilisés seulement si leurs lames sont assez longues.

Des débats concernant le temps nécessaire à la perte de conscience ont eu lieu amenant à proposer de sédater ou d'anesthésier les animaux avant de les guillotiner. Ces mesures ne sont pas systématiquement conseillées car il semblerait que les manipulations et l'injection nécessaires augmenteraient le stress des animaux. Pour les reptiles très résistants à l'hypoxie, ils devraient être rendus insensibles avant la décapitation.

Cette technique présente le désavantage d'être peu esthétique, avec d'énormes pertes de sang et peut entraîner un stress chez l'opérateur.

#### *II.1.1.1.6. Micro-ondes*

Les espèces concernées sont les amphibiens, les oiseaux, les souris et les rats.

Cette méthode est peu utilisée, elle concerne surtout la neurobiologie car elle permet de fixer les métabolites du cerveau sans perte de l'intégrité anatomique. Elle doit être réalisée avec un appareil spécialisé par une personne formée car l'animal doit être correctement positionné.

### **II.1.1.2. Les méthodes physiques sur des animaux inconscients**

#### *II.1.1.2.1. Congélation*

Cette méthode concerne les embryons, les rongeurs et lapins nouveau-nés. Les animaux doivent de toute façon avoir été rendus insensibles avant sa réalisation.

Cette technique permet de diminuer l'activité enzymatique afin de mesurer des paramètres biochimiques. Elle peut également être utilisée chez les poissons et amphibiens. Chez ces animaux le froid est utilisé, dans un premier temps, pour diminuer leur métabolisme avant de les congeler.

#### *II.1.1.2.2. Exsanguination*

Celle-ci nécessite toujours que les animaux aient été rendus insensibles préalablement compte-tenu du stress lié à l'hypovolémie et de la douleur engendrée lors de la section des vaisseaux profonds. Cette méthode ne doit pas être réalisée en présence d'autres animaux.

Les reptiles ayant une grande tolérance à l'hypoxie et le sang des oiseaux ayant tendance à coaguler rapidement entraînant une exsanguination incomplète, cette technique ne doit pas être employée chez ces espèces.

#### *II.1.1.2.3. Décérébration*

Cette technique peut être utilisée chez les poissons, amphibiens et reptiles.

Elle consiste en la section de la moelle épinière par introduction d'une aiguille au niveau du foramen magnum. Elle doit être réalisée sur un animal rendu préalablement inconscient et par une personne compétente car si elle est mal mise en oeuvre l'animal reste conscient.

## **II.1.2. Les méthodes chimiques**

### **II.1.2.1. Méthodes chimiques par inhalation**

#### **II.1.2.1.1. Les méthodes chimiques par inhalation sur des animaux conscients**

##### *II.1.2.1.1.1. Dioxyde de carbone*

A une concentration d'environ 60% le CO<sub>2</sub> agit comme un agent anesthésique et cause une perte de conscience rapide. Cette technique est efficace et humaine pour l'euthanasie des petits animaux à une concentration d'environ 70%.

Le CO<sub>2</sub> stimule les centres respiratoires, il peut causer une anxiété et un stress chez l'animal. De l'acide carbonique peut se former au niveau de la muqueuse nasale, ce qui peut causer une irritation chez certaines espèces même à de basses concentrations.

Pour la plupart des animaux il est recommandé de les placer dans une concentration d'au moins 70% de CO<sub>2</sub> ce qui provoque une perte de conscience rapide. A la concentration de 100% une dyspnée sévère et une détresse chez l'animal conscient peuvent se manifester.

Le CO<sub>2</sub> peut être utilisé chez les oiseaux en association avec de l'Argon ou à de faibles concentrations avec un gaz inerte. Il ne peut être utilisé chez les poissons, les gros animaux, les animaux à sang froid, les animaux creusant des terriers et les jeunes animaux d'âge inférieur à 2 semaines.

La possibilité d'un ajout d'oxygène est évoquée mais il peut être difficile de mixer ces deux gaz en routine.

Il est précisé que le CO<sub>2</sub> étant plus lourd que l'air il faut faire attention à ce que les animaux ne puissent pas grimper pour échapper au gaz. C'est pourquoi il est conseillé de pré remplir la chambre jusqu'à 70%. Cependant certaines publications conseillent un remplissage progressif. La chambre doit être conçue de manière à éviter les blessures et les animaux ne doivent pas y être trop nombreux. La concentration en CO<sub>2</sub> doit être contrôlée. Les extincteurs et le CO<sub>2</sub> solide ne sont pas autorisés comme source de CO<sub>2</sub> à cause de leur basse température et du bruit produit par les extincteurs.

Cette technique sera détaillée par la suite et des recommandations plus récentes émanant du rapport de l'AVMA de 2007 seront présentées (5).

##### *II.1.2.1.1.2. Monoxyde de carbone*

Il peut être utilisé chez les petits animaux, les chats et les chiens mais chez ces derniers des vocalises et des convulsions peuvent se produire après la perte de conscience ce qui est désagréable pour l'opérateur. La mort survient suite à l'hypoxie. Les reptiles ne sont pas concernés à cause de leur résistance à l'hypoxie. Les animaux doivent être introduits dans une chambre pré remplie au moins à 6% supplée par une source de 100% de CO.

Il est nécessaire que l'opérateur prenne des mesures de précaution car ce gaz inodore est extrêmement nocif : un détecteur à CO doit être installé.

##### *II.1.2.1.1.3. Surdosage d'anesthésique volatil*

Ils entraînent une mort par arrêt cardiovasculaire et respiratoire. Il est noté dans les recommandations européennes de 1996 qu'ils n'entraînent pas de stress ce qui est controversé par Leach *et al.* (44).

##### *Halothane*

Il n'est presque plus utilisé compte-tenu de son hépatotoxicité pour le manipulateur.

### *Enroflurane*

Il peut être utilisé lors d'études sur le métabolisme ou de toxicologie car il est très peu métabolisé par le foie.

### *Isoflurane*

Du fait de sa forte odeur, il ne doit pas être utilisé chez les animaux pouvant faire des apnées liées au stress. Il est particulièrement intéressant lors d'étude sur le foie car il modifie peu le métabolisme hépatique.

Les recommandations de l'AVMA de juin 2007 sont par ordre de préférence croissante :

Utilisation de l'halothane, enroflurane, isoflurane, sevoflurane, méthoxyflurane et desflurane avec ou sans protoxyde d'azote pour les petits animaux de poids inférieur à 7kg.

Le méthoxyflurane est un anesthésique halogéné, il n'est plus utilisé notamment à cause de sa toxicité rénale et hépatique. Le sevoflurane et le desflurane sont d'autres anesthésiques halogénés peu utilisés chez l'animal compte tenu de leur coût élevé.

## **II.1.2.1.2. Les méthodes chimiques par inhalation sur des animaux inconscients**

### *Azote/Argon*

La mort est obtenue par hypoxie au bout de quelques minutes durant lesquelles l'animal montre des signes de détresse et de panique (rat). Il est donc nécessaire de pratiquer une anesthésie auparavant.

## **II.1.2.2. Les méthodes chimiques par injection**

Différentes voies peuvent être utilisées : la voie intraveineuse (IV) qui entraîne une mort rapide, la voie intra péritonéale (IP) très utilisée chez les petits animaux du fait de sa facilité d'utilisation, la voie intra-cardiaque (IC) peut être utilisée sur un animal anesthésié.

## **II.1.2.2.1. Les méthodes chimiques par injection sur des animaux conscients**

### *Pentobarbital et autres barbituriques*

Le pentobarbital est souvent utilisé en IV ou en IP. En IV son action est plus rapide et ne provoque pas d'irritation contrairement à la voie IP où des irritations du péritoine sont possibles. La voie IP est surtout utilisée pour des raisons pratiques chez les petites espèces. L'administration intra-cardiaque ne peut être effectuée que sur un animal anesthésié car elle est très douloureuse. L'administration intra-céphalique peut être réalisée chez les oiseaux par un spécialiste.

## **II.1.2.2.2. Les méthodes chimiques par injection sur des animaux inconscients**

### *II.1.2.2.2.1. T61*

Le T61 est un mélange comprenant un anesthésique général (l'embutramide), un bloqueur neuromusculaire (l'iodure de mébézonium), un anesthésique local (le chlorhydrate de tétracaïne). Il entraîne une perte de conscience puis la mort par arrêt respiratoire. Il doit être injecté en IV et très lentement car son injection est très douloureuse. Une anesthésie

préalable doit être effectuée. Il peut parfois provoquer des soubresauts et des tressaillements *post-mortem* désagréables pour l'observateur.

#### *II.1.2.2.2.2. KCl*

Il ne peut être utilisé que sur un animal profondément anesthésié sinon il provoque des vocalises, des spasmes musculaires et des convulsions désagréables pour l'animal et l'observateur. Il est cardiotoxique et provoque un arrêt cardiaque.

#### *II.1.2.2.2.3. Hydrate de chloral*

Il peut être utilisé chez les gros animaux en association avec du sulfate de magnésium et du pentobarbital sodique ou après anesthésie car il est par lui-même très peu analgésique. L'anesthésie est de plus nécessaire car l'action dépressive sur le système nerveux central (SNC) est très lente, des mouvements peu esthétiques et des irritations du péritoine peuvent apparaître car l'injection d'un grand volume est nécessaire.

### **II.1.2.3. Méthodes pour les animaux aquatiques**

#### *II.1.2.3.1. Benzocaïne*

Elle sert à l'euthanasie des poissons et amphibiens par dépression du SNC. Elle doit être préalablement dissoute dans de l'acétone. L'eau dans laquelle elle est versée doit avoir un pH d'environ 7,5 car elle provoque une diminution de celui-ci pouvant causer des irritations. Son temps de dégradation est faible, 4h, ce qui la rend sûre pour l'environnement. La mort doit être contrôlée par un moyen physique.

#### *II.1.2.3.2. MS-222 (Tricaïne méthane sulfonate)*

Le MS-222 est utilisé pour l'euthanasie des poissons et amphibiens. Il provoque une dépression du SNC. Il peut être dissout dans l'eau douce ou salée mais nécessite une neutralisation par du bicarbonate, une imidazole, de l'hydrogénophosphate de sodium, ou de l'hydroxyde de sodium pour éviter une irritation des tissus. Il doit être stocké à l'abri de la lumière.

#### *II.1.2.3.3. Etomidate et métomidate*

Ces produits sont des agents hypnotiques qui agissent par dépression du SNC. Ils sont utilisés pour l'euthanasie des poissons.

#### *II.1.2.3.4. Quinaldine*

La quinaldine et la quinaldine sulfate sont utilisées pour l'euthanasie des poissons surtout aux USA mais il est plus difficile de se les procurer en Europe. Ils induisent une dépression du SNC, leur temps d'induction est relativement long. Il est nécessaire de dissoudre la quinaldine dans de l'acétone.

## II.2. Complément d'information pour l'euthanasie des fœtus de rongeur ou des nouveau-nés

L'euthanasie des fœtus et des nouveau-nés est peu abordée dans le rapport de la commission européenne mais aux USA les IACUC ont publié des lignes directrices à ce sujet (33).

Les fœtus en dessous de 14 jours de gestation ne ressentent pas la douleur compte tenu de leur développement neuronal minimal. L'euthanasie de la mère ou l'isolement du fœtus provoque une mort rapide de celui-ci.

A partir de 15 jours de gestation, les fœtus ressentent la douleur. De 15 jours de gestation à la naissance, les fœtus ne sont pas sensibles aux agents gazeux. Leur euthanasie peut être réalisée par décapitation, dislocation cervicale, immersion dans de l'azote liquide. Si une fixation *in situ* est nécessaire le fœtus doit être préalablement anesthésié. Une anesthésie peut être obtenue par hypothermie, injection d'un anesthésique ou réalisation d'une anesthésie profonde de la mère (le pentobarbital traverse le placenta). Quand les fœtus ne sont pas nécessaires à l'étude, les mères doivent être euthanasiées par une méthode assurant le décès rapide des fœtus.

De la naissance à 16 jours, la décapitation, la dislocation cervicale, l'injection d'une surdose d'anesthésique sont recommandées. L'absence d'anesthésie préalablement à la décapitation ou la dislocation cervicale doit être justifiée scientifiquement. L'immersion dans de l'azote liquide peut être réalisée sans anesthésie jusqu'à 1 jour d'âge ; après l'anesthésie devient nécessaire. L'anesthésie gazeuse peut être utilisée. Le froid peut être utilisé pour induire l'euthanasie sur des animaux jusqu'à 6 jours.

L'euthanasie au CO<sub>2</sub> ne peut être utilisée que sur des rats et souris de plus de 16 jours.

Après avoir présenté les différentes techniques préconisées par les recommandations européennes (23, 24), les principales techniques soumises à controverse vont être évoquées. La décapitation et la dislocation cervicale sur animal vigile surtout sujettes à polémique dans les années 1980-1990, puis l'euthanasie par inhalation de CO<sub>2</sub> actuellement au cœur d'une controverse notamment dans le cadre de la révision de la directive 86/609/CEE (18).

### **III. Etude bibliographique des principales techniques d'euthanasie controversées**

#### **III.1. Euthanasie par décapitation**

##### **III.1.1. Le Débat**

La décapitation est une technique qui a été approuvée dans les lignes directrices de l'AVMA de 1978 (2). Cette technique, bien que peu esthétique, était alors considérée comme rapide, peu chère, procurant une mort instantanée si elle était réalisée correctement.

Pourtant, un article de Mikeska et Klemm publié en 1975 a montré que suite à la décapitation de rats, l'électroencéphalogramme (EEG) montrait une activité LVFA (bas voltage et activité rapide) pendant 13,6±4,6 secondes et une activité électrique pendant encore 27,2±4,4 secondes. Ils concluent de ces observations que la décapitation n'était pas une méthode humaine, l'activité LVFA serait un signe de conscience accompagné de douleur (47).

En 1978, Warren écrit au Journal de l'AVMA (JAVMA) douter de la rapidité de la perte de conscience affirmée dans le rapport de 1978. Il s'appuie sur l'article de Mikeska et Klemm. Il écrit que compte tenu de la perte de sang, la conscience de la douleur serait relativement courte mais que la souffrance serait extrême. Le terme d'euthanasie serait donc inapproprié pour cette technique (57).

Suite à ces critiques, l'AVMA a ajouté des conditions à l'utilisation de la décapitation dans les lignes directrices de 1986 : celle-ci devait être réalisée sur un animal sédaté ou légèrement anesthésié ; dans le cas où ces conditions ne seraient pas remplies, la tête de l'animal décapité devrait être immédiatement plongée dans de l'azote liquide (3).

Ces recommandations furent vivement critiquées et donnèrent lieu à la rédaction de plusieurs articles attaquant les conclusions de Mikeska et Klemm (47).

En 1987, Allred et Bernston déclarent qu'anesthésier les animaux avant de les décapiter risque de stopper des études sur les régulations métaboliques notamment hépatiques, ces paramètres étant fortement modifiés par une anesthésie.

Ils critiquent la recommandation de placer la tête de l'animal décapité immédiatement dans un bain d'azote liquide car il a été montré que pour un rein de 0,5 gramme la température au cœur de celui-ci était encore de 30°C après 20 secondes. Le temps de refroidissement d'un cerveau de rat serait donc supérieur aux 13 à 14 secondes durant lesquelles on observe une activité LVFA chez l'animal décapité (1).

Enfin ils infirment l'interprétation de Mikeska et Klemm que la conscience serait maintenue durant la période d'activité de l'EEG et que l'activité de l'EEG serait un signe de douleur. En effet, l'activité bêta observée ne serait pas forcément synonyme de douleur, on la retrouve d'ailleurs lors du sommeil paradoxal (REM) : elle ne pourrait être liée qu'aux changements physiologiques majeurs accompagnant l'hypoxie et l'ischémie voire à des artefacts expérimentaux. Ils concluent que la décapitation précédée ou non de la perte de conscience par assommement de l'animal est une technique humaine et nécessaire à la conduite de certaines études (1, 47).

Lorden affirme, de plus, que si l'on interprète l'activité LVFA comme un signe de douleur, sachant que l'anesthésie prolonge sa présence, on arrive à la conclusion absurde que l'anesthésie prolonge la conscience de la douleur. Il souligne également que la chute de la pression sanguine liée à la décapitation provoquerait à une perte de conscience rapide (45).

Klemm défend sa thèse en répondant que la conscience devient manifeste lors de l'éveil, de l'attention, de la perception de l'imagination, de la mémoire, de la prise de

décision, de la pensée en général. Ces processus cognitifs sont difficilement mesurables chez l'animal mais pour Klemm ce n'est pas parce qu'on ne peut pas les mesurer que l'on doit considérer qu'ils ne se produisent pas. Il explique également que le problème au cœur de la controverse sur la décapitation n'est pas de savoir si elle est nociceptive car elle l'est par définition, mais de savoir si elle provoque de la douleur ce qui est fonction du degré de conscience qui permettrait au stimulus nociceptif d'être perçu comme douloureux. Il défend également la recommandation de plonger la tête de l'animal décapité dans de l'azote liquide, en affirmant qu'il n'est pas nécessaire de refroidir tout le cerveau mais seulement la formation réticulée, ce qui suffirait à bloquer la conscience. Enfin, il explique que le prolongement de l'activité LFVA par l'anesthésie serait dû au ralentissement du métabolisme et de l'excitabilité neuronale induits, amenant à une activité plus longue avec une réponse nociceptive moins intense (41).

En 1988, Vanderwolf *et al.* rapportent que l'activité EEG de la tête d'un animal décapité est plus proche de celle d'un animal anesthésié que de celle d'un animal percevant une douleur.

L'activité LVFA peut en fait être produite par deux systèmes de neurotransmetteurs différents et indépendants. Le premier système est un système cholinergique se projetant sur la base du cerveau antérieur. Son activité peut être abolie par l'atropine et est présente aussi bien chez un animal conscient que chez un animal anesthésié. Le second système est un système sérotoninergique se projetant sur le noyau du raphé. Ce système ne peut être aboli par l'atropine et n'est activé que chez l'animal conscient. Lors de la décapitation c'est le premier système qui est activé et il semble peu probable que celui-ci soit lié à de la douleur (56).

En 1991, Derr montre que le degré de conscience après décapitation ne peut être maintenu plus de 2,7 secondes, compte tenu la quantité de sang présente dans le cerveau et du degré d'utilisation de l'oxygène (22).

En 1992, Holson part du principe que même si l'on considère que la conscience est conservée pendant 14 secondes, il faut encore prouver qu'il y a souffrance. Deux problèmes se posent alors. Le premier est anatomique : si la moelle épinière est sectionnée, il y a une perte immédiate de sensation en dessous de la section ; en fonction du trajet des fibres et du plan de section, cette perte de sensation peut également concerner la région antérieure (C2, C3). De plus, même si la section est effectuée en dessous de ce plan, le traumatisme majeur engendré par la décapitation serait rarement accompagné par une perception immédiate de douleur, on parle de « gating théorie ». Holson ajoute que s'il est nécessaire de tremper la tête de l'animal décapité dans de l'azote liquide, la tête de l'animal ayant subi une dislocation cervicale devrait être traitée de manière identique puisque celle-ci présente le même EEG. Il conclut que la décapitation, bien que peu esthétique, est non seulement nécessaire à des fins scientifiques (les Institutional Animal Care and Use Committees (IACUC) et le National Institutes of Health (NIH) ayant d'ailleurs permis d'en continuer l'utilisation), mais est d'après lui la plus humaine de toutes les méthodes d'euthanasie. Enfin il ajoute que devoir anesthésier les animaux avant de les décapiter aurait pour conséquence d'augmenter leurs souffrances au lieu de les diminuer (32).

En 1993, Bosland essaye d'analyser le conflit entre les conclusions de Holson et les recommandations de L'AVMA de 1993 (Cf. III.1.2.1.). Même si la mesure de pression sanguine n'a jamais été réalisée sur la tête d'un animal décapité, un changement de couleur dans les yeux des rats albinos décapités est instantanément visible, reflétant probablement l'arrêt de la perfusion au niveau de la tête ce qui est en faveur d'une perte de conscience immédiate. De plus, le réflexe cornéen considéré comme un signe de coma chez l'homme et comme un signe d'anesthésie profonde chez l'animal, est aboli. D'après des considérations

anatomiques, il est normal que ce réflexe soit aboli chez un animal décapité au niveau de la jonction atlanto-occipitale mais il ne devrait pas l'être si la section est réalisée en dessous de ce plan. La perte du réflexe cornéen lors de la décapitation en dessous de la jonction atlanto-occipitale serait alors un signe de perte de conscience.

Bosland conclut que bien qu'il n'y ait pas de preuves certaines de l'absence de douleur lors de la décapitation, cette hypothèse semble la plus probable (10).

### **III.1.2. Les différentes recommandations**

#### **III.1.2.1. Les recommandations des Etats-Unis**

Le rapport de l'AVMA de 1993, suite à la controverse suscitée par le rapport de 1986, précisait que cette technique pouvait être utilisée en recherche seulement si une justification scientifique était apportée et que son utilisation était approuvée par un IACUC (4).

Le dernier rapport de l'AVMA de 2007 prend en compte les différentes études concernant la décapitation et précise que bien que l'activité électrique cérébrale persiste pendant 13 à 14 secondes après décapitation, il semble que l'animal n'éprouve pas de douleur et que la perte de conscience soit rapide.

Les avantages de cette technique sont donc : une perte de conscience rapide, une absence de contamination des tissus, une rapidité d'exécution.

Les inconvénients sont : la nécessité d'une contention pouvant être stressante pour l'animal, l'existence d'une activité cérébrale persistante après la décapitation toujours sujette à débat, la nécessité d'un personnel entraîné afin d'éviter les blessures et le caractère peu esthétique de cette méthode (ces avantages et inconvénients sont les mêmes que ceux rapportés en 1993).

Les recommandations d'utilisation sont les suivantes : cette technique est acceptable si elle est réalisée par du personnel entraîné et est vraiment nécessaire au protocole expérimental. Ceci est évalué par un IACUC qui doit donner son autorisation. L'équipement utilisé doit être contrôlé régulièrement surtout les lames qui doivent être tranchantes. Enfin l'utilisation de cônes en plastique afin de contraindre l'animal semble diminuer son stress et limiter le risque de blessure chez le manipulateur (5).

#### **III.1.2.2. Les recommandations canadiennes**

Le CCAC recommande dans le « Manuel sur les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire » de 1993 de séduire ou d'anesthésier les animaux avant de les décapiter. De toute façon la décapitation comme méthode d'euthanasie doit être défendue scientifiquement par le chercheur et approuvée par un Comité de Protection des Animaux (CPA) (12).

#### **III.1.2.3. Les recommandations européennes**

Dans les recommandations européennes de 1996, il est fait référence au débat concernant la durée précédant la perte de conscience de l'animal : une anesthésie ou une sédation préalables à la décapitation ne sont pas recommandées du point de vue du bien-être animal, leur réalisation risquant d'induire un stress supplémentaire (23).

### **III.1.3. Impact biologique de la décapitation comme technique d'euthanasie**

En 1973, Carney et Walker ont comparé, entre autres, les taux de corticostérone plasmatique après euthanasie au pentobarbital (prélèvement à l'aorte abdominale) et après décapitation. Les taux de corticostérone ne différaient pas. L'euthanasie par décapitation n'induirait pas plus de stress que celle par surdosage de pentobarbital (13).

En 1989, Schrieffer *et al.* ont comparé les concentrations plasmatiques de sodium et de potassium chez le rat vigile, décapité ou euthanasié au pentobarbital. Ils ont abouti à la conclusion que la décapitation augmentait fortement le taux de potassium et modérément celui de sodium alors que l'euthanasie au pentobarbital n'entraînait qu'une faible augmentation du potassium et pas d'augmentation du sodium. L'euthanasie au pentobarbital serait donc préférable pour l'étude de ces concentrations ioniques (50).

En 1990, Mathe *et al.* ont comparé les concentrations de 5 neuropeptides : la substance P (SP), la neurokinine A (NKA), le neuropeptide Y (NPY), la neurotensine (NT) et le peptide vaso-intestinal (VIP) dans le cerveau après euthanasie par décapitation ou par utilisation de micro-ondes. Il s'est avéré que les concentrations de SP, NKA et NT étaient beaucoup plus élevées lors de l'utilisation de micro-ondes ce qui serait lié à l'inactivation des enzymes de dégradation et à une extraction facilitée de ces neuropeptides avec cette technique. L'utilisation de micro-ondes serait plus indiquée pour l'étude de ces neuropeptides (46).

### **III.1.4. Influence d'une anesthésie préalable à la décapitation**

L'influence de l'anesthésie peut être multiple, voir les quelques exemples présentés ci-dessous et dans le tableau 2.

En 1990, Kasten *et al.* ont mesuré le niveau de Fructose-2,6-Biphosphate dans différents tissus de rats après décapitation sans anesthésie, décapitation après une anesthésie à la kétamine, à l'hydrate de chloral, au pentobarbital ou par une association chloralose-halothane. Ils ont trouvé que les concentrations de Fructose-2,6-Biphosphate étaient augmentées dans le cerveau, le rein et le cœur lors de l'utilisation d'un anesthésique. Les concentrations dans le muscle squelettique étaient augmentées lors de l'anesthésie au chloralose-halothane, diminuées lors de l'anesthésie à la kétamine et elles étaient stables lors de l'anesthésie au pentobarbital et à l'hydrate de chloral. Enfin les concentrations dans le foie restaient identiques quelle que soit la technique d'euthanasie employée. Ce dernier résultat ne concorde pas avec les résultats d'une précédente étude pour laquelle l'utilisation de kétamine diminuait fortement les concentrations de Fructose-2,6-Biphosphate dans le foie, mais ces résultats ne sont pas tout à fait comparables compte tenu d'une durée d'exposition différente. L'emploi d'un anesthésique préalablement à la décapitation modifierait donc le métabolisme du glucose (39).

En 1990, Butler *et al.* ont comparé les effets de différentes méthodes d'euthanasie : décapitation, surdose de pentobarbital, anesthésie au CO<sub>2</sub>, au méthoxyflurane ou à l'éther suivies d'une décapitation, sur le métabolisme de l'acide arachidonique (production de prostaglandines) au niveau vasculaire et sur la contractilité du muscle lisse intestinal. Il s'est avéré que, quel que soit l'anesthésique utilisé, le métabolisme de l'acide arachidonique était modifié. Ces techniques se révèlent donc peu adaptées à l'étude de ces paramètres (11).

En 1994, Berger-Sweeney *et al.* ont montré qu'une anesthésie préalable au CO<sub>2</sub> ne modifiait pas les concentrations de cholinestérase et de choline acétyltransférase dans le cerveau au niveau de l'hippocampe, du cortex et du cervelet. Cette technique pourrait donc être utilisée afin d'étudier ces paramètres cholinergiques dans ces trois parties du cerveau (9).

**Tableau 2 : Effets biologiques de la décapitation, tableau réalisé à partir du « Report of the ACLAM Task Force on Rodent Euthanasia » (6)**

Technique utilisée	Effets
Décapitation	Augmentation du Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> (50), Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> plasmatique Augmentation des concentrations de GABA dans le cerveau Augmentation de l'Alanine dans le cerveau Augmentation de l'acide ascorbique plasmatique Augmentation du niveau de catécholamine dans le sang Augmentation du corticostérone dans le sérum Altération de la fonction mitochondriale dans le cœur chez le rat Pas de changement du VIP et du NPY dans le cerveau (46)
Méthoxyflurane et décapitation	Augmentation des prostacyclines (11) Diminution de la contractilité vasculaire (11)
Kétamine et décapitation	Pas de changement des récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone dans l'utérus de rat Pas de modification des concentrations de LH et FSH dans le sérum de rat adulte Diminution des concentrations de LH et FSH dans le sérum de rat immature Diminution de la concentration de testostérone dans le sérum de rat adulte et immature Augmentation de la concentration de prolactine dans le sérum de rat adulte Augmentation de la concentration de fructose-2,6-biphosphate dans le cerveau, le cœur, le rein (39) Diminution de la concentration de fructose-2,6-biphosphate dans le muscle squelettique (39) Pas de changement de la concentration de fructose-2,6-biphosphate dans le foie ou diminution en fonction des études. (39)
Pentobarbital et décapitation	Augmentation du relargage d'acétylcholine dans le cerveau. (9) Pas de modification des concentrations de LH et FSH dans le sérum de rat immature et adulte. Diminution de la concentration de testostérone dans le sérum de rat adulte et immature Augmentation de la concentration de prolactine dans le sérum de rat adulte Augmentation de la concentration de fructose-2,6-biphosphate dans le cerveau, le cœur, le rein (39) Pas de changement de la concentration de fructose-2,6-biphosphate dans le muscle squelettique, dans le foie (39)
Halothane et décapitation	Augmentation de l'acide ascorbique plasmatique Augmentation des catécholamines plasmatiques Pas de modification des concentrations de LH et FSH dans le sérum de rat adulte Diminution des concentrations de LH et FSH dans le sérum de rat immature Diminution de la concentration de testostérone dans le sérum de rat adulte et immature Augmentation de la concentration de prolactine dans le sérum de rat adulte
CO <sub>2</sub> et décapitation	Taux de corticostérone, LH, FSH, prolactine normaux Activité des marqueurs cholinergiques identique à celle observée lors de la décapitation uniquement (9) Altération de la fonction des récepteurs GABA <sub>A</sub>
Thiopental et décapitation	Pas de modification des concentrations de LH et FSH dans le sérum de rat immature et adulte. Diminution de la concentration de testostérone dans le sérum de rat adulte
Xylazine et décapitation	Pas de modification des concentrations de LH et FSH dans le sérum de rat immature et adulte. Diminution de la concentration de testostérone dans le sérum de rat adulte et immature Augmentation de la concentration de prolactine dans le sérum de rat adulte
Hydrate de chloral et décapitation	Augmentation de la concentration de fructose-2,6-biphosphate dans le cerveau, le cœur, le rein (39) Pas de changement de la concentration de fructose-2,6-biphosphate dans le muscle squelettique, dans le foie (39)
Halothane-chloralose et décapitation	Augmentation de la concentration de fructose-2,6-biphosphate dans le cerveau, le cœur, le rein, dans le muscle squelettique (39) Pas de changement de la concentration de fructose-2,6-biphosphate dans le foie (39)

En conclusion, si l'on prend en compte les différents articles traitant de la décapitation il apparaît que malgré une activité cérébrale persistant pendant 13 à 14 secondes, l'animal n'éprouverait pas de douleur et la perte de conscience serait rapide lorsque cette technique est effectuée par un opérateur expérimenté. L'anesthésie préalable ne serait pas nécessaire. Mais compte tenu de la difficulté aussi bien technique (contention de l'animal, risque de blessure de l'opérateur et de l'animal) que psychologique pour l'opérateur, il convient tout de même de se demander si une décapitation sous anesthésie ou l'utilisation d'une autre technique ne serait pas plus adaptée.

La décapitation est d'ailleurs soumise à autorisation que ce soit au Canada ou aux Etats-Unis. Des preuves (documents, raisonnements scientifiques...) qu'aucune autre technique ne peut être utilisée doivent être apportées ce qui est relativement difficile au regard de la bibliographie concernant les effets biologiques des différentes techniques d'euthanasie. (cf. tableaux 2 et 3)

### **III.2. Euthanasie par dislocation cervicale**

Tout comme l'euthanasie par décapitation, l'euthanasie par dislocation est source de controverse mais à une échelle moindre.

Dans le rapport de l'AVMA de 2007, il est précisé que la dislocation cervicale apparaît être une technique humaine quand elle est réalisée par une personne bien entraînée mais qu'il y a peu d'études le confirmant.

Des données suggèrent que comme pour la décapitation une activité électrique cérébrale persisterait pendant les 13 secondes suivant la dislocation sauf que dans ce cas on ne peut justifier d'une perte de conscience rapide liée à l'exsanguination.

Les avantages présentés sont une perte de conscience qui reste tout de même rapide, une absence de contamination chimique, une rapidité d'exécution.

Les désavantages de cette technique sont qu'elle est peu esthétique, nécessite des compétences techniques pour induire une perte de conscience rapide, et d'une utilisation limitée aux poulets et autres petits oiseaux, souris, rats et lapins immatures.

(5).

Pour utiliser cette technique le chercheur doit apporter une justification scientifique et un IACUC USA doit approuver sa demande. Dans un article de 2004 paru dans *Laboratory Animal*, il est fait référence à un refus d'autorisation d'utilisation de la dislocation cervicale suite à un manque de justification du chercheur. Pour pouvoir utiliser cette technique il ne suffit pas d'affirmer que l'utilisation d'un anesthésique ou d'un agent gazeux risque de modifier les données physiologiques, il faut apporter des preuves, des documents, un raisonnement scientifique et pouvoir prouver les compétences de l'opérateur (19, 26, 38).

En 1999, Jones *et al.* ont montré qu'une anesthésie au CO<sub>2</sub> préalable à une dislocation cervicale ne provoquait pas de modification des concentrations de sérotonine, dopamine et de noradrénaline dans le cerveau. L'anesthésie au CO<sub>2</sub> préalable à la dislocation cervicale pourrait donc être une technique utilisable pour étudier ces neurotransmetteurs (37).

En 2007, dans un article de Cartner *et al.* (14) l'EEG et les VEP (potentiel évoqué visuel indiquant une réponse corticale focale à un stimulus lumineux) ont été enregistrés sur des animaux anesthésiés sous respiration artificielle pendant les 30 secondes suivant leur euthanasie par décapitation, dislocation cervicale, inhalation de CO<sub>2</sub> à 70% et à 100%, ou injection de KCl. Cette expérience a montré que la décapitation, la dislocation cervicale et l'euthanasie avec 100% de CO<sub>2</sub> entraînaient une diminution rapide de l'EEG et des VEP et donc une perte des fonctions corticales rapide. Le KCl lui n'entraînait qu'une diminution rapide de l'EEG non accompagnée d'une diminution des VEP, la perte des fonctions corticales était donc relativement longue. Lors de l'utilisation de 70% de CO<sub>2</sub> on n'observait qu'une faible diminution des VEP compatible avec une anesthésie.

Les 21 souris euthanasiées par dislocation cervicale ont été radiographiées : sur ces 21 souris, 2 ne montraient pas de séparation atlanto-occipitale, alors que chez ces souris une diminution de l'EEG et des VEP était pourtant observée. Il faut, de plus, noter que 5 souris présentaient en plus de la séparation atlanto-occipitale, une séparation au niveau des vertèbres thoraciques. Ces observations relèvent la difficulté technique de ce geste et la nécessité d'une anesthésie.

Malgré le peu de bibliographie, cette technique apparaît difficile à réaliser même sur des souris anesthésiées puisque sur les 21 souris euthanasiées par cette technique, deux ne montraient pas de séparation atlanto-cervicale et cinq présentaient en plus une dislocation des vertèbres thoraciques. On peut s'interroger sur l'existence d'une souffrance chez ces sept souris si elles n'avaient pas été anesthésiées au préalable.

Dans les recommandations européennes, il est d'ailleurs précisé que si possible l'animal devrait être préalablement sédaté ou anesthésié (23).

Une dislocation cervicale sans anesthésie devrait être correctement justifiée par des preuves, des documents (*cf.* tableau 3) et un raisonnement scientifique et réalisée par un opérateur formé, comme demandé par les IACUC.

**Tableau 3 : Effets biologiques de la dislocation cervicale, tableau réalisé à partir du « Report of the ACLAM Task Force on Rodent Euthanasia » (6)**

<b>Technique utilisée</b>	<b>Effets</b>
Dislocation cervicale	Diminution du flux coronaire Diminution de la fonction contractile des préparations de cœur isolé perfusé Prolifération lymphocytaire normale Niveau de sérotonine élevé dans les poumons Augmentation du nombre de macrophage et de granulocytes formant colonie dans les cultures de moelle osseuse de souris
Dislocation cervicale sous méthoxyflurane	Augmentation de la prolifération des lymphocytes (mitogènes induits) Réponse des LTc normale
Dislocation cervicale sous pentobarbital	Augmentation de la prolifération des lymphocytes (mitogènes induits) Diminution de la réponse des LTc
Dislocation cervicale sous halothane	Pas de modification de la prolifération des lymphocytes (mitogènes induits) Diminution de la réponse des LTc
Dislocation cervicale sous CO <sub>2</sub>	Pas de modification de la prolifération des lymphocytes (mitogènes induits) Diminution de la réponse des LTc Pas de modifications des concentrations de sérotonine, dopamine et de norépinephrine dans le cerveau (37)

### III.3. Euthanasie au dioxyde de carbone

L'euthanasie des rongeurs au CO<sub>2</sub> est une technique fréquemment employée par les laboratoires de recherche. Elle permet en effet d'euthanasier un grand nombre d'animaux rapidement et elle présente peu de danger pour l'opérateur, est rapide et peu chère. Pourtant sur un plan éthique, cette technique est actuellement très controversée car elle entraînerait un inconfort voire de la douleur chez l'animal (5, 17, 28, 29).

D'ailleurs le dernier rapport de l'AVMA de juillet 2007 y fait référence : « Certains investigateurs ont suggéré que l'inhalation de haute dose de CO<sub>2</sub> pourrait entraîner une douleur chez les animaux, liée à la dissolution du gaz dans l'humidité de la muqueuse nasale. De l'acide carbonique serait alors produit et stimulerait les nocicepteurs de cette muqueuse. De plus des études sur les humains ont montré que l'inhalation de CO<sub>2</sub> à la concentration de 50% est perçue comme déplaisante et qu'à plus forte dose elle est perçue comme nocive. En ce qui concerne les rats, s'ils sont euthanasiés dans leur propre cage, on ne relève pas de signe de stress que ce soit au niveau du comportement, des concentrations d'ACTH, de glucose et de corticostérone plasmatiques. » (5).

Dans le cadre de la révision de la directive européenne 86/609, une éventuelle interdiction de l'utilisation du CO<sub>2</sub> sur des animaux vigiles a été évoquée (48).

Cette controverse concernant l'emploi du CO<sub>2</sub> n'est pas récente : en effet de nombreux articles, parfois contradictoires, font état de son éventuel manque d'« humanité » (5, 17, 28, 29).

Afin de mieux cerner le problème, les généralités sur l'euthanasie au gaz seront, dans un premier temps, abordées, puis nous focaliserons sur l'euthanasie au CO<sub>2</sub> : ses mécanismes d'action, la controverse qui l'entoure, les tentatives d'amélioration et solutions de remplacement de cette technique enfin nous évoquerons les dernières conclusions sur le sujet avec le meeting de Newcastle (29) et les recommandations de l'AVMA de 2007 (5).

#### III.3.1. Généralités sur l'euthanasie par inhalation de gaz

Pour être efficace les gaz doivent atteindre une concentration donnée dans les alvéoles pulmonaires, ce qui nécessite un certain temps. Le caractère plus ou moins humanitaire des gaz utilisés est donc fonction de l'existence d'une détresse de l'animale entre le moment où l'animal commence à inhaler le gaz et celui où il perd conscience.

Certaines considérations sont communes à tous les gaz :

- Plus la concentration de gaz est élevée, plus la perte de conscience survient rapidement ;
- Le matériel utilisé doit être en **bon état**, un appareil défectueux pouvant induire une mort lente et douloureuse des animaux et d'éventuels risques sanitaires chez les opérateurs ;
- Les agents gazeux ne doivent pas être utilisés chez les animaux à **la ventilation diminuée** ou chez les **animaux d'âge inférieur à 16 jours** plus résistants à l'hypoxie. D'autres méthodes doivent alors être envisagées ;
- Lors d'utilisation de gaz à haut débit il est important de veiller à ce que **le bruit** soit limité afin de ne pas stresser les animaux ;
- Les animaux euthanasiés dans une même chambre doivent être de la **même espèce**. Les chambres ne doivent **pas être surchargées** et doivent être **nettoyées régulièrement** afin d'éliminer les odeurs pouvant générer du stress (23).

### III.3.2. Mécanisme d'action du CO<sub>2</sub>

L'anhydride carbonique agit directement sur les systèmes essentiels. Il se répand dans le sang à partir des poumons. Le pouvoir tampon du sang est alors dépassé. Le pH sanguin diminue, on parle d'acidose.

Lorsque les concentrations d'acide carbonique sont faibles entre 5 et 35 %, l'acidose respiratoire modérée entraîne une augmentation compensatoire de l'intensité et du rythme respiratoires afin d'expulser l'excès de CO<sub>2</sub>. Ces modifications sont accompagnées de changements du rythme cardiaque et de la pression artérielle.

Des concentrations plus importantes mènent à une acidose respiratoire plus profonde, déprimant les centres respiratoires du cerveau et conduisant à une respiration plus lente.

Avec la perte de la capacité tampon du sang, le pH du liquide cérébro-spinal chute brutalement provoquant une insensibilité à la douleur et enfin la mort.

La mort peut également survenir suite à des troubles cardiaques : arythmies puis arrêt du cœur, provoqués par l'acidose.

### III.3.3. Controverse autour de l'utilisation du CO<sub>2</sub>

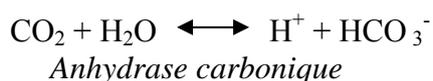
#### III.3.3.1. Les causes de la controverse

Certains articles rapportent une acidification des muqueuses, des signes de détresse et d'asphyxie, des lésions histologiques ayant pu causer de la douleur et de la détresse avant que l'animal ne perde conscience (17, 29, 54).

De plus des études réalisées chez l'homme ont rapporté que des concentrations élevées de CO<sub>2</sub> étaient perçues comme douloureuses (20, 6).

##### III.3.3.1.1. Formation d'acide carbonique au niveau des membranes oculaires, nasales, buccales et du tractus respiratoire

Au niveau des muqueuses le CO<sub>2</sub> se dissout dans l'eau pour former, sous l'action de l'anhydrase carbonique, de l'acide carbonique. L'acide carbonique causerait une sensation de brûlure (29).



##### III.3.3.1.2. Activation de nocicepteurs chez le rat anesthésié

D'après Thürauf (54), Kobal a décrit, en 1985, des potentiels négatifs au niveau de la muqueuse respiratoire humaine suite à une stimulation par du CO<sub>2</sub>.

En 1991 Thürauf *et al.* essayent de déterminer l'origine de ces potentiels négatifs chez le rat ; pour cela ils utilisent une stimulation rétrograde à l'aide d'un tube introduit dans le nasopharynx. Ils arrivent à la conclusion que ces potentiels seraient bien des signaux périphériques neurogènes probablement générés par les nocicepteurs eux-mêmes (54).

Le CO<sub>2</sub> engendrerait donc une activation des nocicepteurs au niveau de la muqueuse nasale et donc une sensation douloureuse.

### III.3.3.1.3. Observations comportementales de signes de douleur

Les observations rapportées lors de l'inhalation de CO<sub>2</sub> pouvant indiquer une douleur sont les suivantes : locomotion accrue, excitation, agitation, défécation, miction, tentative d'échappement, toilettage fréquent, dyspnée, hyperventilation, halètement, tête tournée vers le haut et l'arrière (16, 17, 20, 35, 44, 53). La fréquence et l'intensité de ces signes ont tendance à augmenter avec la concentration en CO<sub>2</sub>. (17, 43, 44)

Pour Conlee, l'ataxie associée au début des effets du CO<sub>2</sub> pourrait également être un signe de douleur : en effet rien ne prouve que l'ataxie ne soit pas, en elle-même, désagréable pour l'animal (17).

### III.3.3.1.4. Lésions histologiques

Les lésions rapportées sont les suivantes : extravasation alvéolaire, œdème pulmonaire, hémorragie, emphysème, écoulements séro-hémorragiques pour des concentrations de 50% de CO<sub>2</sub> ou encore dégénérescence du tissu myocardique et d'autres organes (17, 35). Certaines de ces lésions pourraient être à l'origine de douleurs si leur survenue précède la perte de conscience.

Certains auteurs rapportent que les lésions d'hémorragie pulmonaire seraient plus nombreuses lors de l'utilisation de concentrations de CO<sub>2</sub> élevées alors que d'autres trouvent le résultat inverse (20). La survenue d'hémorragie pulmonaire plus importante pour des concentrations de CO<sub>2</sub> faible pourrait être expliqué par un allongement du temps d'exposition nécessaire pour provoquer la mort. Récemment (2000), l'évolution de l'œdème et la densification alvéolaire (induration inflammatoire des poumons) ont été étudiées sur des échantillons prélevés du moment de la perte de conscience jusqu'à la mort lors de l'utilisation d'un mélange de 30% de CO<sub>2</sub> et de 20% d'O<sub>2</sub> ou seulement 30% de CO<sub>2</sub>. Cette étude a mené ses auteurs à conclure que les animaux euthanasiés par un mélange de 30% de CO<sub>2</sub> et de 20% d'O<sub>2</sub> présentaient plus rapidement une densification alvéolaire, celle-ci commençant juste avant la perte de conscience et qu'ils ressentaient donc peut-être une sensation proche de celle de la noyade (17).

Feldman et Gupta rapportent principalement la présence de sang dans les alvéoles et une congestion pulmonaire vasculaire (25).

### III.3.3.1.5. Aversion vis à vis du CO<sub>2</sub>

En 2005, Kirkden *et al.* ont testé l'aversion induite par le CO<sub>2</sub> : des rats ayant été privés de nourriture en recevaient lorsqu'ils restaient dans une enceinte contenant du CO<sub>2</sub>. Ces animaux quittaient toujours l'enceinte avant de perdre conscience. Ils montraient un comportement de fuite directe : ils se mettaient à renifler, faisaient une réserve de nourriture dans leur bouche puis se dirigeraient directement vers la sortie. Lorsque les rats étaient dans la même enceinte sans CO<sub>2</sub>, ils terminaient la nourriture et n'en emportaient jamais hors de l'enceinte. Des expériences du même type, réalisées chez des poulets, ont montré que ceux-ci restaient dans l'enceinte jusqu'à perdre conscience pour bénéficier de nourriture ou de contacts sociaux (40). D'après Kirkden *et al.*, l'hypothèse d'une augmentation de l'activité locomotrice par le gaz émise par Wood ne pourrait donc pas être retenue ici (59).

### III.3.3.1.6. Evaluation du temps nécessaire à la perte de conscience

Un problème majeur de la technique d'euthanasie au CO<sub>2</sub> est la détermination du moment de la perte de conscience afin d'évaluer si l'animal a ou non le temps de ressentir de la douleur. De nombreux auteurs ont essayé de mesurer ce temps mais leurs résultats diffèrent (*cf.* tableaux 4 et 5), ce qui peut en partie s'expliquer par des critères d'évaluation différents (survenue d'un coma apparent, réflexe en réponse au pincement de patte, flaccidité musculaire, mesure de la pression artérielle...). D'autres facteurs de variation ont pu intervenir comme les équipements et méthodes, la taille des groupes euthanasiés ou encore la concentration de gaz utilisée.

En utilisant une chambre pré remplie avec 70% de CO<sub>2</sub>, Danneman trouve un temps de perte de conscience de 4,01 minutes en observant le début de la respiration lente et superficielle et la perte de réponse au pincement de patte. Mischler trouve lui un temps d'au maximum 10 secondes en observant la survenue d'un coma apparent, la flaccidité musculaire, l'absence de réponse à une forte pression exercée sur la queue (20). Enfin Smith et Harrap rapportent un temps moyen de 26,6 secondes en se basant sur le moment où l'animal ne fait plus aucun mouvement (53).

**Tableau 4 : Récapitulatif des différents temps nécessaires à induire la perte de conscience et la mort chez la souris en fonction du pourcentage de CO<sub>2</sub> et de la technique utilisée. (17)**

Référence	Chambre préremplie (R)/remplissage progressif (P)	Pourcentage de CO <sub>2</sub>	Temps nécessaire à la perte de conscience (en secondes)	Temps nécessaire à la mort (en secondes)
Ambrose <i>et al.</i> (2000) cité par Conlee (17)	P	50%	93,4	235,6
Blackshaw <i>et al.</i> (1988) cité par Conlee (17)	R	97%	12,8	48
Britt (1986) cité par Conlee (17)	R	100%	14	38
Iwarrson et Rehbinder (1993) (35)	R	100%	8	35

**Tableau 5 : Récapitulatif des différents temps nécessaires à induire la perte de conscience et la mort chez le rat en fonction du pourcentage de CO<sub>2</sub> et de la technique utilisée. (17)**

Référence	Chambre préremplie (R)/remplissage progressif (P)	Pourcentage de CO <sub>2</sub>	Temps nécessaire à la perte de conscience (en secondes)	Temps nécessaire à la mort (en secondes)	Critères d'évaluation de la perte de conscience
Coenen <i>et al.</i> (1995) (16)	P, 2,5l/min	?	65	530	
	P, 22,5l/min	?	40	395	
Hackbarth <i>et al.</i> (2000) (28)	P, 6l/min	55%	85		Relaxation totale, perte de conscience apparente
Hewett <i>et al.</i> (1993) (30)	P	100%	109-109 139-144,4	374	
Hornett et Haynes (1984) (33)	P	?	160		
Smith et Harrap (1997) (53)	P, 10l/min	75%	97,2	541,2	Absence totale de mouvement
Golledge <i>et al.</i> (2005) (27)	P, 20%/min	100%	132-152	327+/-8	Mesure de la pression artérielle
Blackshaw <i>et al.</i> (1988) cité par Conlee (17)	R	97%	7,8	135	
	R	97%	11,8	78	
Britt (1986) cité par Conlee (17)	R	100%	18	171	
Coenen <i>et al.</i> (1995) (16)	R	100%	30	408	
Hewett <i>et al.</i> (1993) (30)	R	100%	19 27,8	109,2	
Iwarrson et Rehbinder (1993) (35)	R	100%	13	116	
Smith et Harrap (1997) (53)	R	75%	26,4	311,4	Absence totale de mouvement
Golledge <i>et al.</i> (2005) (27)	R	100%	38	192	Mesure de la pression artérielle
Lawson <i>et al.</i> (2006) (42)	R	100%	37 +/-3	188 +/-15	
	R	30%	150 +/-15	440 +/-9	

### III.3.3.1.7. Etudes réalisées chez l'Homme

En 1992, Anton *et al.* ont appliqué des concentrations déterminées de CO<sub>2</sub> sur la muqueuse nasale chez l'homme : ils ont trouvé un seuil de douleur compris entre 32,5 et 55% de CO<sub>2</sub> avec une moyenne de 46,6 et 47,1% en fonction des groupes (6).

En 1997, Danneman, *et al.* ont réalisé une étude sur l'effet de l'exposition au CO<sub>2</sub> chez les rats et chez l'homme (20). Ils justifient cette étude en s'appuyant sur le fait que l'innervation de l'épithélium respiratoire et nasal est la même chez l'homme et le rat et que la stimulation de la muqueuse nasale par le CO<sub>2</sub> induit des effets neurophysiologiques similaires chez l'homme et le rat. Vingt volontaires ont donc été exposés à 6 concentrations de gaz : 100%O<sub>2</sub>, 50%CO<sub>2</sub>, 60%CO<sub>2</sub>, 70%CO<sub>2</sub>, 80%CO<sub>2</sub>, 100%CO<sub>2</sub>. Chaque volontaire a été exposé deux fois à chacune des concentrations dans un ordre aléatoire avec, entre chaque exposition, un temps de récupération de 2 minutes. Le volontaire devait prendre si possible une inspiration complète. Après chaque exposition, il devait évaluer le degré de douleur sur une échelle (VAS) allant de 1 à 10 avec 1=pas du tout désagréable, 3=désagréable mais pas inconfortable, 5=inconfortable mais pas douloureux, 7=douloureux mais tolérable, 10= très douloureux, intolérable.

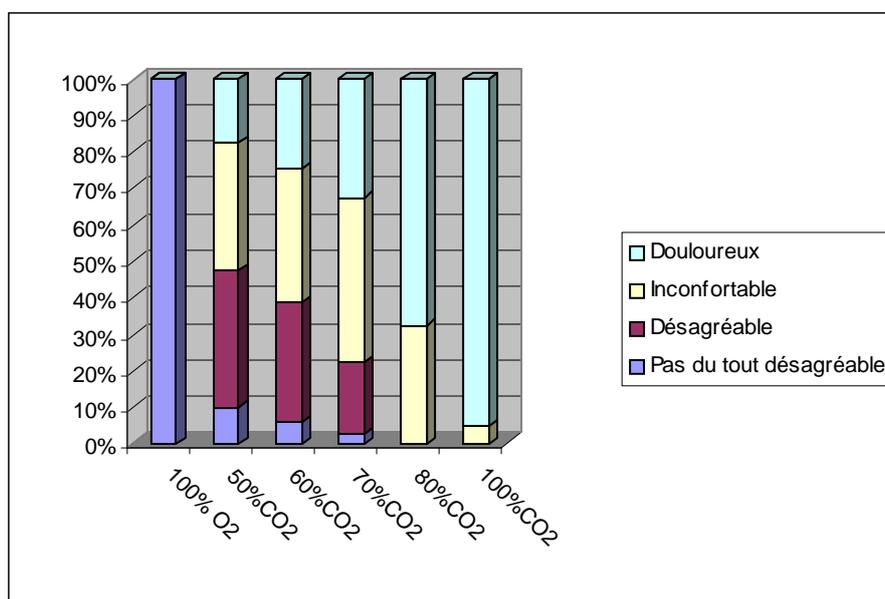
Les résultats sont exposés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 6 : Evaluation du degré de douleur perçue par des humains en fonction de différentes concentrations en pourcentage de CO<sub>2</sub>. (20)**

% de gaz	Pas du tout désagréable (1-2,9)	Désagréable (3-4,9)	Inconfortable (5-6,9)	Douloureux (7-10)
100% O <sub>2</sub>	40	-	-	-
50%CO <sub>2</sub>	4	15	14	7
60%CO <sub>2</sub>	3	7	18	12
70%CO <sub>2</sub>	1	8	18	13
80%CO <sub>2</sub>	-	-	13	27
100%CO <sub>2</sub>	-	-	2	38

(Evaluation réalisée sur 20 volontaires, exposés deux fois à chaque concentration)

**Figure 1 : Graphique tiré du tableau 6 représentant les différents degrés de douleur perçus en fonction de la concentration en pourcentage en CO<sub>2</sub>.**



Il fut également demandé aux participants d'exprimer dans leurs propres termes ce qu'ils avaient ressenti juste après l'exposition aux différentes concentrations. Les termes qui revinrent plus de 10 fois, toutes concentrations confondues, furent les suivants : sensation de brûlure, incapacité à prendre une inspiration complète, incapacité à prendre plus d'une inspiration, brûlure/ larmes au niveau des yeux, sensation de douleur, inconfort, goût bizarre/désagréable/ odeur, toux, sensation désagréable, sensation de picotement, sensation perçante/lancinante. Les termes revenant les plus souvent pour de faibles concentrations (50/60%) étaient une sensation de brûlure, un inconfort, un goût bizarre, une sensation désagréable. Pour une concentration de 100%, les termes revenant presque pour tous les participants étaient : une sensation de brûlure, une incapacité à prendre une pleine inspiration ou plus d'une inspiration ; d'autres termes revenaient souvent : une sensation de brûlure au niveau des yeux, une douleur, une sensation perçante et lancinante. Cette étude révèle l'agressivité du CO<sub>2</sub> pour l'homme même pour des concentrations modérées. Dès 50% de CO<sub>2</sub>, seul 20% des volontaires ne ressentent aucune gêne et déjà plus de 50% ressentent un véritable inconfort.

### **III.3.3.2. Les tentatives d'amélioration de la technique**

De nombreuses tentatives ont été réalisées afin d'améliorer la technique d'euthanasie au CO<sub>2</sub> (16, 17, 28, 30, 35, 53, 29).

#### **III.3.3.2.1. Chambre pré remplie versus remplissage progressif**

L'utilisation d'une chambre pré remplie par rapport à une chambre au remplissage progressif a été largement étudiée mais aucune conclusion claire n'en est ressortie (30, 53, 29). Dans les deux cas, des signes de stress sont présents chez les animaux exposés.

D'après Conlee (17), Britt rapporte, en 1986, que l'utilisation d'une chambre pré remplie entraînerait une mort plus rapide mais serait plus stressante. Les signes observés étaient les suivants : tremblements, tentative de fuite, battements de queue, augmentation de la fréquence des mictions et des défécations. Il faut noter que l'augmentation des mictions et de la défécation peut n'être qu'une conséquence de l'activation du système nerveux autonome et peut donc être remise en cause en tant que facteur indicateur de stress.

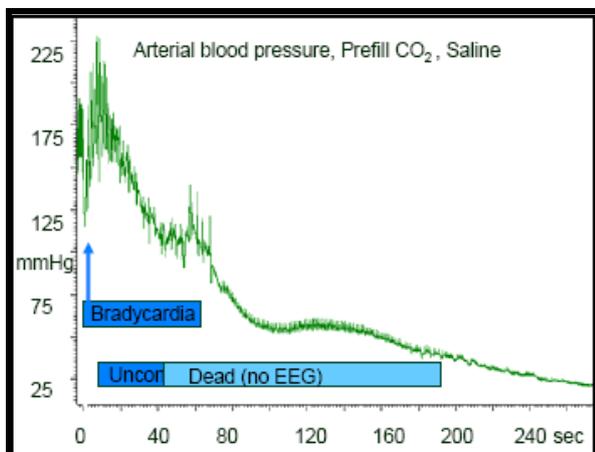
En 1993, Hewett *et al.* rapportent que le temps nécessaire à la perte du réflexe au pincement de patte est 3 fois plus long lors de l'utilisation de la chambre à remplissage progressif, 140 secondes versus 28 secondes. Dans les deux cas, des signes de détresse non explicités étaient observés (30).

En 1997, Smith et Harrap trouvent un temps nécessaire à induire l'inconscience de 30 secondes en utilisant une chambre pré remplie (80%CO<sub>2</sub>, 3%O<sub>2</sub>) et un temps de 99 secondes en utilisant une chambre à remplissage progressif (75%CO<sub>2</sub>, 3%O<sub>2</sub>). Le temps nécessaire à provoquer la mort est lui aussi beaucoup plus long lors de l'utilisation d'une chambre à remplissage progressif, 9 minutes versus 5,4 minutes. Lors de l'utilisation des deux techniques, des signes de détresse étaient observés : mouvement de tête, miction, défécation, respiration laborieuse, halètement (53).

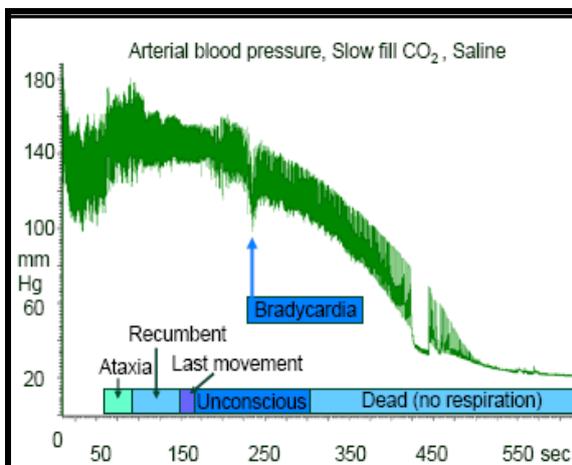
En 2006, une étude réalisée à l'université de Newcastle a mesuré la pression artérielle, le temps nécessaire à l'apparition d'une bradycardie ainsi que certains paramètres comportementaux lors de l'utilisation d'une chambre pré remplie par rapport à une chambre où le remplissage était progressif 20%/minute (*cf.* figures 2 et 3). Les paramètres comportementaux étaient les suivants : ataxie, décubitus, dernier mouvement, inconscience et mort (29).

Certains rats ont reçu de la lidocaïne par infiltration de la muqueuse nasale afin de bloquer les nocicepteurs et d'autres de l'acétazolamide afin de bloquer la formation d'acide.

**Figure 2 : Suivi de la pression artérielle en fonction du temps chez le rat lors de l'exposition dans une chambre pré remplie à 100% de CO<sub>2</sub> (27)**



**Figure 3 : Suivi de la pression artérielle en fonction du temps chez le rat lors de l'exposition dans une chambre à remplissage progressif en CO<sub>2</sub> (27)**



Les résultats sont les suivants : (cf. tableau 7)

Suite à une exposition à 100% de CO<sub>2</sub> une bradycardie est immédiatement observée indiquant une activation des nocicepteurs et une irritation nasale. La perte de conscience survient rapidement mais pendant 10 secondes il se peut que l'animal éprouve de la douleur. Le remplissage progressif provoque une perte de conscience avant l'apparition de la bradycardie et donc de l'irritation nasale. La pression artérielle chute peu ce qui est compatible avec un effet du CO<sub>2</sub>. Le temps nécessaire à la perte de conscience est de 132 à 152 secondes et survient pour une concentration de CO<sub>2</sub> d'environ 35-39%. La bradycardie ne survient qu'à 220-280 secondes pour une concentration de CO<sub>2</sub> de 45-50% soit bien après la perte de conscience. La mort cérébrale survient à 327+/-8 secondes. D'un point de vue éthique, les difficultés respiratoires ainsi que les mouvements cloniques surviennent pendant l'anesthésie profonde, ce qui ne pose pas de problèmes de bien-être. On observe que les traitements à la lidocaïne et à l'acétazolamide n'ont que peu d'effet sur les paramètres mesurés ce qui indiquerait que la douleur induite par l'euthanasie dans une enceinte à remplissage progressif ne serait pas un facteur significatif. L'EEG, la fréquence cardiaque, la pression sanguine ne montrent pas de signe d'éveil ou de stress. D'autres effets du CO<sub>2</sub> peut-être stressants, peuvent survenir en début d'exposition comme de la tachypnée (29).

**Tableau 7: Comparaison des effets physiologiques en chambre pré saturée versus chambre à remplissage progressif en CO<sub>2</sub> (29)**

	<b>Chambre pré saturée (100%)</b>	<b>Chambre à remplissage progressif 20%/min</b>
<b>Effets néfastes avant la perte de conscience</b>	Douleur, potentiellement sévère	Pas de douleur mais d'autres signes : détresse, inconfort, dyspnée.
<b>Temps avant le début des effets néfastes</b>	Instantané	Ataxie vers 55 secondes
<b>Temps nécessaire à la perte de conscience</b>	38+/-2 secondes	156+/-5 secondes
<b>Temps nécessaire à l'inactivité corticale</b>	45 secondes	5-6 minutes

En conclusion, il n'y a pas de consensus clairement établi sur l'utilisation d'une chambre pré remplie plutôt que sur celle d'une chambre à remplissage progressif. Mais d'après l'étude réalisée à Newcastle, il me semble plus favorable d'utiliser une enceinte à remplissage progressif, l'activation des nocicepteurs étant postérieure à la perte de conscience, les traitements préalables à l'euthanasie ne révélant pas l'existence d'une douleur.

### III.3.3.2.2. Mélange Oxygène et Dioxyde de Carbone

Concernant l'utilisation d'un mélange de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, des études arrivant à des conclusions parfois contradictoires ont été menées.

Dans une étude réalisée par Iwarsson et Rehbinder en 1993 la présence d'O<sub>2</sub> (80% CO<sub>2</sub>/ 20%O<sub>2</sub> versus 100%CO<sub>2</sub>) semble diminuer les signes comportementaux de détresse, mais aussi les effets sur la respiration, la fréquence des mictions et des défécations. Des lésions pulmonaires sont observées dans les deux cas (17, 35).

Dans une étude de 1995, Coenen a divisé la réponse à l'euthanasie au CO<sub>2</sub> en 4 phases :

- Phase I : l'animal présente un comportement normal, notamment un comportement exploratoire, ses mouvements sont bien coordonnés,
- Phase II : l'animal est très excité, agité, il présente une activité continue,
- Phase III : l'animal présente une abolition du tonus musculaire, ses pattes s'affaissent, sa tête tombe,
- Phase IV : l'animal est immobile, excepté des contractions musculaires et des mouvements réflexes, après une dernière contraction l'animal fait un arrêt respiratoire.

La présence d'O<sub>2</sub> fait disparaître la phase II. Il conclut donc que la présence d'O<sub>2</sub> diminue les effets néfastes du CO<sub>2</sub>. En fait, comme Iwarsson et Rehbinder, il compare les effets de 100% de CO<sub>2</sub> versus les effets d'un mélange de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>. La concentration de CO<sub>2</sub> étant plus faible cela pourrait suffire à expliquer la diminution des effets néfastes observés (16, 17).

Ambrose *et al.* en 2000 comparent l'effet de 30% de CO<sub>2</sub> par rapport à l'effet d'un mélange de 30% de CO<sub>2</sub> avec de l'O<sub>2</sub>, ils ne trouvent aucune différence comportementale chez les animaux. Ils trouvent en revanche que la présence d'O<sub>2</sub> augmenterait la consolidation alvéolaire ce qui donnerait à la souris la sensation de se noyer. Ils concluent donc que l'ajout d'O<sub>2</sub> n'améliorerait pas la technique (17).

La présence d'oxygène ne semble pas modifier le temps nécessaire à induire la mort à concentrations de CO<sub>2</sub> égales. (*cf.* tableaux 4, 5, 8 et 9)

**Tableau 8 : Récapitulatif des différents temps nécessaires à induire la perte de conscience et la mort chez la souris en fonction du pourcentage de CO<sub>2</sub> et d'O<sub>2</sub> et de la technique utilisée (17)**

Référence	Chambre préremplie (R)/remplissage progressif (P)	Pourcentage de CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	Temps nécessaire à la perte de conscience (en secondes)	Temps nécessaire à la mort (en secondes)
Ambrose <i>et al.</i> (2000) cité par Conlee (17)	P (lent: 110s)	50%/50%	93,4	250,5
	P (rapide: 30-40s)	50%/50%	65	177,8
Britt (1986) cité par Conlee (17)	P	70,8%/5,5%	55	242
Iwarsson et Rehbinder (1993) (35)	P	80%/20%	13	130

**Tableau 9 : Récapitulatif des différents temps nécessaires à induire la perte de conscience et la mort chez le rat en fonction du pourcentage de CO<sub>2</sub> et d'O<sub>2</sub> et de la technique utilisée (17)**

Référence	Chambre préremplie (R)/remplissage progressif (P)	Pourcentage de CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	Temps nécessaire à la perte de conscience (en secondes)	Temps nécessaire à la mort (en secondes)
Britt (1986) cité par Conlee (17)	P	61,5%/7,88%	70	395
Coenen <i>et al.</i> (1995) (16)	P	80%/20%	50	618
Iwarrson et Reh binder (1993) (35)	P	80%/20%	27	196

Il semble difficile de déterminer si l'ajout d'O<sub>2</sub> provoque ou non une diminution des signes de détresse : en effet dans les études concluant à cette possibilité la concentration de CO<sub>2</sub> seul était supérieure à celle présente dans le mélange avec l'O<sub>2</sub>. On peut donc se demander si le fait d'utiliser une concentration de CO<sub>2</sub> plus faible ne serait pas suffisant pour expliquer la diminution des signes de détresse. L'étude comparant des concentrations de CO<sub>2</sub> similaires plus ou moins ajout d'O<sub>2</sub> n'a d'ailleurs pas montré de différence.

### III.3.3.2.3. Réalisation préalable d'une anesthésie ou d'une sédation

Hackbarth *et al.*, en 2000, ont comparé le comportement, les taux d'ACTH, de glucose et de corticostérone de rats euthanasiés avec du CO<sub>2</sub>, ayant reçu préalablement de l'acépromazine per os dans de la nourriture, de la nourriture seule, une injection de pentobarbital sodique ou seulement d'une solution saline. La seule différence qui en ressort est l'élévation du taux d'ACTH chez les rats ayant reçu une injection. Cette élévation pouvant être expliquée par le stress engendré par la manipulation (28).

### III.3.3.2.4. Autres facteurs

La littérature indique que lorsque l'euthanasie gazeuse est réalisée dans la cage où l'animal vit avec ses congénères habituels, cela a un impact mesurable en terme de bien-être.

En conclusion il n'y a pas de consensus clairement établi quant aux différentes techniques d'amélioration ; l'utilisation d'une chambre à remplissage progressif versus une chambre pré-remplie semble tout de même devoir être privilégiée d'après les résultats de l'étude réalisée à Newcastle en 2006 (29). Afin de statuer sur un éventuel ajout d'O<sub>2</sub>, des études complémentaires semblent nécessaires. Enfin la réalisation d'une sédation *per os* ou intra péritonéale préalable à l'anesthésie (28) semble irréalisable en pratique, l'intérêt de l'euthanasie au CO<sub>2</sub> étant d'euthanasier un grand nombre d'animaux simultanément. De plus si l'on réalise une sédation intra péritonéale préalablement à l'euthanasie au CO<sub>2</sub>, il semblerait plus simple d'effectuer directement une euthanasie par surdosage d'anesthésique (pentobarbital par exemple).

### III.3.3.3. Les solutions de remplacement

Certains auteurs ont comparé les effets du CO<sub>2</sub> par rapport à ceux d'autres gaz (15, 17, 33, 42, 43, 44).

En 1984, Hornett et Haynes, lors d'une comparaison entre l'argon et le CO<sub>2</sub>, montraient que l'argon provoquait des réactions de panique avec des tentatives d'échappement et des convulsions alors que le CO<sub>2</sub> ne provoquait qu'une augmentation d'amplitude des mouvements respiratoires et à terme une respiration difficile. De plus le temps nécessaire pour induire la mort est beaucoup plus long avec l'argon qu'avec le CO<sub>2</sub> (33).

En 1985, Clifford *et al.* exposent de jeunes rats (110-120g) à du CO<sub>2</sub>, de l'halothane ou un mélange de ces deux gaz ; ils observent l'apparition de signes de détresse et le temps nécessaire à induire la mort. Ils concluent qu'on observe plus de signes de détresse quand les rats sont mis en présence de CO<sub>2</sub> seul ou en mélange que cela se fasse dans une chambre pré remplie ou dans une chambre à remplissage progressif. Ils concluent également que l'arrêt respiratoire survient plus vite lors de l'association des deux gaz chez les jeunes rats adultes (15).

Leach *et al.* ont comparé l'aversion provoquée par 5 agents anesthésiques (l'isoflurane, l'halothane, l'enroflurane, le desflurane, le sevoflurane) par rapport au CO<sub>2</sub> (44) et par l'argon par rapport au CO<sub>2</sub> (43), au CO<sub>2</sub> humidifié, au CO<sub>2</sub> associé à l'O<sub>2</sub> ou à l'argon chez des rats Wistar et des souris BALB/c. Pour évaluer l'aversion, deux types d'appareil ont été utilisés. Le premier appareil, pour les rats, comprenait deux chambres, l'une pouvant être remplie de gaz anesthésiant ou euthanasiant et l'autre étant remplie d'air. Le deuxième, pour les souris, comprenait une chambre pouvant être remplie de gaz anesthésiant ou euthanasiant, et quatre autres chambres remplies d'air (*cf.* figure 4). Les compartiments étaient séparés par des portes en plastique souple. Les paramètres étudiés étaient les suivants :

- Tw : Temps mis par l'animal pour quitter la chambre lors du premier contact avec le gaz
- Tr : Temps mis par l'animal pour entrer à nouveau dans la chambre après un premier contact avec le gaz
- Td : Temps total passé par l'animal dans la chambre
- Nombre d'entrées
- Nombre de sorties

Au niveau du comportement, la fréquence avec laquelle les animaux se levaient sur leurs pattes arrières, présentaient un comportement de « grooming », reniflaient au niveau de la zone d'entrée, déféquaient et urinaient a été mesurée.

Les seuls paramètres s'étant révélés significatifs sont le Tw et le Td.

Les résultats de cette étude montrent que tous les agents étaient aversifs et que le degré d'aversion était fonction de l'agent et de sa concentration.

Concernant le Td, il est plus court avec le CO<sub>2</sub> pour le rat et la souris que pour tous les autres agents anesthésiants.

Concernant l'argon, on a observé que le Td pour le rat est plus long que pour le CO<sub>2</sub> seul, humidifié ou mélangé avec de l'O<sub>2</sub> ou de l'azote ; pour la souris, on a noté un Tw plus long pour l'argon.

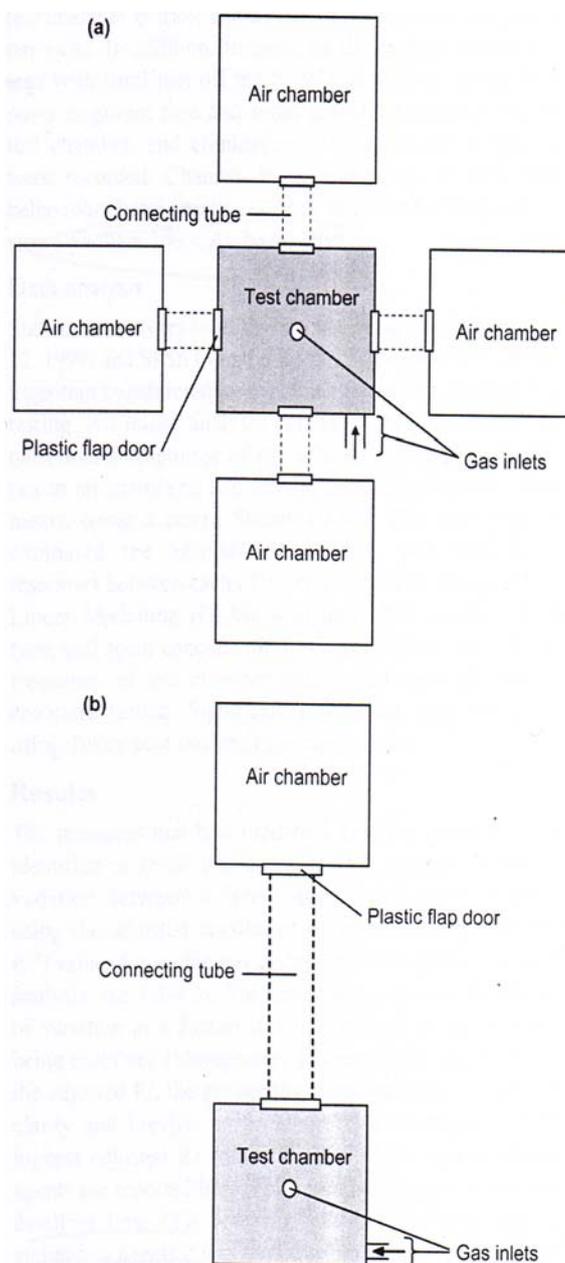
Concernant les agents anesthésiants, on a observé un Td plus long que pour tous les autres agents avec l'halothane chez le rat et l'enroflurane avec la souris.

Si l'on classe les agents euthanasiant par degré d'aversion croissant chez le rat on obtient : l'halothane, le sevoflurane, le desflurane, l'enroflurane, l'isoflurane et le CO<sub>2</sub> et chez la souris : l'enroflurane, le sevoflurane, l'halothane, l'isoflurane, le desflurane et le CO<sub>2</sub>.

En conclusion, Leach recommande de préférer l'utilisation de l'argon seul pour l'euthanasie ou alors l'utilisation d'un agent anesthésiant (halothane 3-4% chez le rat et enroflurane : 5% chez la souris) suivie du CO<sub>2</sub> ou de l'argon (43, 44).

Au niveau des comportements liés à un degré d'aversion, seule la fréquence des toilettes était augmentée.

**Figure 4 : Schéma des chambres utilisées par Leach *et al.* (44)**



**(a)** Test apparatus for mice, consisting of a central test chamber surrounded by four identical air chambers (all chambers are 260 mm x 165 mm x 70 mm). **(b)** Test apparatus for rats, consisting of a test chamber connected to an identical air chamber (both chambers are 278 mm x 278 mm x 156 mm). Wire mesh tubes connect test and air chambers in both apparatus and each entry/exit point has a plastic door flap. The test chamber has two gas inlets, one in the centre of the chamber top and one at floor level.

Pour Conlee *et al.*, lorsqu'un petit nombre d'animaux doit être euthanasié, la décapitation est une solution de remplacement envisageable. Il précise tout de même que l'emploi de cette méthode est aussi controversé. Il propose également comme alternative l'utilisation d'argon ou d'anesthésique suivi de CO<sub>2</sub> (17).

En 2006, Lawson D *et al.* ont comparé les effets du CO<sub>2</sub>, de l'argon et de l'azote pour induire l'inconscience et la mort chez le rat. Pour cela, ils ont observé le temps nécessaire pour obtenir l'inconscience puis la mort avec des concentrations de 100% de CO<sub>2</sub>, d'argon, et d'azote, et de 30% de CO<sub>2</sub>. Ils ont, pour toutes ces concentrations, enregistré la fréquence cardiaque et la pression artérielle moyenne (MAP : Mean Arterial Pressure) par télémetrie. Ils ont également enregistré les données correspondantes pour des animaux mis dans la chambre d'euthanasie ne contenant que de l'air pour évaluer l'effet de l'environnement. Ils ont observé que la chambre induisait en elle-même une augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle moyenne ainsi que du nombre de mouvements pendant les 8 minutes durant lesquelles l'animal se trouvait dans celle-ci. Pour eux, cela justifierait de placer les animaux dans une enceinte pré-remplie ou de chercher un système dans lequel l'euthanasie s'effectuerait dans la cage où vit l'animal.

Lors de l'euthanasie par inhalation de CO<sub>2</sub>, aucun signe de stress n'a été observé ce qui incite à penser que cette technique reste utilisable que ce soit pour provoquer l'inconscience ou la mort.

Concernant l'argon, ce gaz pourrait être utilisé comme technique d'euthanasie ; il faudrait cependant faire des études supplémentaires car il pourrait être stressant pour l'animal : en effet la pression artérielle moyenne est augmentée pendant une minute et l'on observe une hyper réactivité lors du toucher de l'animal et une tachycardie prolongée lorsque l'animal apparaît inconscient.

Concernant l'azote, il ne peut être utilisé pour induire l'inconscience et la mort compte tenu du temps nécessaire à induire celles-ci à concentrations de CO<sub>2</sub> et d'argon égales (100%) (42) (*cf.* tableau 10).

**Tableau 10 : Temps nécessaires pour induire l'inconscience et la mort chez le rat par différents gaz, d'après les données de Lawson D *et al.* en 2006 (42)**

Gaz utilisé	Temps nécessaire pour induire l'inconscience (en secondes)	Temps nécessaire pour induire la mort (en secondes)
CO2 100%	37 +/-3	188 +/-15
CO2 30%	150 +/-15	440 +/-9
Argon 100%	54 +/-4	197 +/-20
Azote 100%	164 +/- 17	426 +/-28

Peu d'informations sont disponibles concernant l'emploi d'autres gaz comme agents euthanasiant. L'azote ne semble pas pouvoir être utilisé comme technique d'euthanasie au vu des signes de panique qu'il provoque et compte tenu du temps nécessaire à induire la perte de conscience et la mort chez l'animal (*cf.* tableau 11).

D'après le résultat des études menées par Leach *et al.* (43) et Lawson D *et al.* (42), l'argon semble pouvoir être utilisé comme technique d'euthanasie (*cf.* tableau 12).

Enfin la possibilité d'utiliser un agent anesthésiant puis le CO<sub>2</sub> ou l'argon après la perte de conscience comme évoqué par Leach *et al.* (44) semble très intéressante mais il n'existe aucune information sur la réalisation pratique de cette proposition. Cette proposition a d'ailleurs été évoquée dans l'enquête réalisée par la commission européenne dans le cadre de la révision de la directive 86/609/CEE (48) : l'halothane était cité mais pose un problème de sécurité pour l'opérateur (hépatotoxicité).

**Tableau 11 : Tableau récapitulatif concernant l'utilisation de l'azote par rapport à l'utilisation du CO<sub>2</sub>**

	<b>CO<sub>2</sub> (100%)</b>	<b>Azote (100%)</b>
Hornett et Haynes (1984) (Rat) (33)	↑ d'amplitude des mouvements respiratoires et à terme respiration difficile	Réactions de panique avec des tentatives d'échappement et des convulsions
Lawson D <i>et al.</i> (2006) (42) (Rat)	↑MAP pdt 12 secondes puis ↓  Temps nécessaire à induire l'inconscience : 37+/-3 secondes  Temps nécessaire à induire la mort : 164+/-17 secondes	MAP= pdt 60 secondes, hyper réactivité  Temps nécessaire à induire l'inconscience : 188+/-15 secondes  Temps nécessaire à induire la mort : 426+/-28 secondes
<b>→L'azote ne peut être utilisé pour l'euthanasie.</b>		

**Tableau 12 : Tableau récapitulatif concernant l'utilisation de l'argon par rapport à l'utilisation du CO<sub>2</sub>**

	<b>CO<sub>2</sub> (100%)</b>	<b>Argon (100%)</b>
Leach <i>et al.</i> (2002 et 2004) (Rat et souris) (43)	↑ Fréquence de lavage	Rat : Td>au Td du CO <sub>2</sub> Souris : Tw>au Tw du CO <sub>2</sub>
Lawson D <i>et al.</i> (2006) (42) (Rat)	↑ MAP pdt 12 secondes puis ↓  Temps nécessaire à induire l'inconscience: 37+/-3 secondes  Temps nécessaire à induire la mort: 164+/- 17 secondes	↑ MAP pdt 60 secondes Hyper réactivité, tachycardie, stress?  Temps nécessaire à induire l'inconscience : 54+/-4 secondes  Temps nécessaire à induire la mort : 197+/-20 secondes
<b>→L'argon peut être utilisé comme technique d'euthanasie. Leach et al conseillent de privilégier son utilisation par rapport au CO<sub>2</sub>.</b>		

Suite à la parution de toutes ces publications, un meeting sur l'euthanasie au CO<sub>2</sub> a été organisé en février 2006 à Newcastle réunissant les scientifiques ayant travaillé sur la technique (29). Les conclusions de ce meeting sont présentées ci-dessous.

### **III.3.3.4. Le meeting de Newcastle sur l'euthanasie par l'anhydride carbonique des animaux de laboratoire du 27 au 28 février 2006 (29)**

#### **III.3.3.4.1. Objectifs**

Le but de ce meeting était

- de rassembler les scientifiques ayant examiné la technique d'euthanasie au CO<sub>2</sub> afin d'obtenir un consensus sur la meilleure manière de l'utiliser,
- d'identifier les points de désaccords et les études qu'il faudrait effectuer afin d'y apporter des réponses,
- de savoir quelles études ont besoin d'être réalisées sur le sujet en général,
- de répondre au besoin immédiat d'avoir des lignes directrices concernant cette technique,
- de savoir quelles sont les alternatives disponibles.

#### **III.3.3.4.2. Conclusions**

##### *III.3.3.4.2.1. Les problèmes*

- Il n'y a pas de façon idéale d'utiliser la technique d'euthanasie au CO<sub>2</sub> : que la chambre soit pré saturée ou que le remplissage soit progressif, des problèmes de bien-être animal se posent.
- Si un animal est placé dans une chambre contenant une grande concentration en CO<sub>2</sub>, il ressent une douleur pendant au moins 10 à 15 secondes.
- Si le remplissage est progressif, les animaux ressentent l'effet aversif du CO<sub>2</sub> et présentent des difficultés respiratoires rapportées comme déplaisantes lors des essais réalisés sur des sujets humains.

##### *III.3.3.4.2.2. Les bonnes pratiques d'utilisation*

- Il est, de l'avis général, plus important d'éviter ou de minimiser la douleur et la détresse plutôt que d'obtenir une perte de conscience plus rapide. Une mort plus longue sans douleur est préférable à une mort plus rapide accompagnée de douleur.
- Le taux de remplissage optimum de la chambre est incertain. Il a été montré qu'un débit de remplissage de 20% par minute n'induit pas de signes évidents de douleur mais des signes de dyspnée restent présents. L'avantage d'utiliser un faible débit est qu'il peut être augmenté après la perte de conscience pour induire une mort rapide.
- L'addition d'O<sub>2</sub> semble diminuer mais pas supprimer les signes de douleur et de dyspnée. En revanche, l'ajout d'O<sub>2</sub> semble prolonger la conscience ce qui n'est pas souhaitable. Le peu d'informations disponibles ne permet pas d'atteindre une conclusion claire sur un taux d'O<sub>2</sub> approprié à utiliser.

##### *III.3.3.4.2.3. Les méthodes alternatives utilisant des agents gazeux*

- Il n'est pas possible, à l'heure actuelle, de recommander des gaz provoquant la mort par hypoxie comme l'argon, l'azote, le monoxyde de carbone, l'hélium, le xénon pour l'euthanasie des rats et souris. L'hypoxie est peut-être une méthode préférable pour d'autres espèces mais on ne peut généraliser cette recommandation et il n'y a pas assez de données concernant l'effet de ces gaz chez les rongeurs.

- Les anesthésiques gazeux peuvent être des alternatives. Ils pourraient être utilisés comme agent euthanasiant seul ou comme agent anesthésiant avec ajout de CO<sub>2</sub> pour induire la mort.

#### *III.3.3.4.2.4. Recherches futures*

- Des recherches approfondies doivent être effectuées pour étudier les effets physiologiques et émotionnels d'une large gamme d'agents gazeux, pour identifier des bonnes pratiques et des alternatives possibles à l'emploi du CO<sub>2</sub>. Cela requiert une approche multidisciplinaire et une bonne communication entre les chercheurs.

Après ce meeting, l'AVMA a révisé en 2007 ses recommandations sur l'euthanasie des animaux de laboratoire (5). Les recommandations sur l'euthanasie au CO<sub>2</sub> de ce rapport sont donc les plus récentes et apparaissent plus fiables que les recommandations européennes de 1996-1997 (23, 24).

### **III.3.3.5. Les avantages, inconvénients de la technique au CO<sub>2</sub> et recommandations du rapport de l'AVMA de juillet 2007 (5)**

#### **III.3.3.5.1. Les avantages**

- Le CO<sub>2</sub> a rapidement un effet dépresseur, analgésique et anesthésique bien établi.
- Il est facile de s'en procurer sous forme de bouteille de gaz comprimé.
- Il est peu cher, ininflammable, non explosif et présente un minimum de risque pour le personnel si un équipement correct est utilisé.
- Il ne modifie pas les marqueurs cholinergiques murins ni les concentrations de corticostérone.

#### **III.3.3.5.2. Les inconvénients**

- Le CO<sub>2</sub> étant plus lourd que l'air, un remplissage incomplet de la chambre peut permettre aux animaux de grimper ou soulever leur tête au dessus des concentrations de gaz élevées et d'éviter l'exposition.
- Certains animaux sont plus résistants au CO<sub>2</sub> comme les poissons, les mammifères creusant des terriers ou plongeant.
- La respiration lente des reptiles pose également un problème quant à l'utilisation du CO<sub>2</sub>.
- L'euthanasie au CO<sub>2</sub> est relativement longue par rapport à d'autres méthodes.
- L'induction de la perte de conscience aux concentrations inférieures à 80% peut produire des lésions pulmonaires et des voies aériennes supérieures.
- Des concentrations élevées de CO<sub>2</sub> peuvent entraîner une détresse chez certains animaux.

#### **III.3.3.5.3. Les recommandations**

- Le CO<sub>2</sub> n'est recommandé que pour **certaines espèces**. Il peut être utilisé chez les oiseaux, les chats, les chiens, les poissons, les animaux utilisés pour leur fourrure, les lapins, certains reptiles, les rongeurs et autres petits mammifères, les cochons et les animaux de zoo. Il peut être éventuellement utilisé pour l'euthanasie de primates non humains et d'animaux sauvages.

- La seule source de CO<sub>2</sub> recommandée est le **CO<sub>2</sub> en bouteille** car il permet un apport de gaz contrôlé avec précision. Le CO<sub>2</sub> produit par la glace carbonique, la neige carbonique des extincteurs ou par des produits chimiques est inacceptable.
- **Les espèces doivent être séparées et les chambres non surchargées.**
- Le débit optimal devrait être **d'au moins 20% par minute** lors de l'utilisation d'une enceinte à remplissage progressif. La perte de conscience peut être induite plus rapidement en exposant les animaux à une concentration de **70% ou plus** dans une chambre pré remplie pour les espèces chez qui cela ne provoque pas l'apparition de souffrances.
- Le flux doit être maintenu **au moins une minutes après la mort clinique**. La mort de l'animal doit être contrôlée. Si l'animal n'est pas mort une méthode d'euthanasie complémentaire devra être pratiquée.
- L'ajout d'O<sub>2</sub> au CO<sub>2</sub> pourrait prévenir les signes de souffrance, mais le temps nécessaire à la mort de l'animal serait plus long et le moment de la perte de conscience plus difficile à évaluer. En conclusion, **il apparaît que l'ajout d'O<sub>2</sub> ne présente aucun avantage.**

Le CO<sub>2</sub> bien qu'étant une technique très utilisée paraît donc présenter un certain nombre de problèmes éthiques : irritations des muqueuses (29), activation des nocicepteurs chez le rat anesthésié (54), induction de réaction comportementale de détresse (16, 17, 20, 35, 44, 53), aversion marquée par rapport à d'autres gaz (40, 43, 44), lésions histologiques (17, 20, 25), temps nécessaire à la perte de conscience long (16, 17, 20, 28, 29, 30, 33, 35, 42, 53). De plus des expériences réalisées chez l'homme ont montré que l'inhalation de CO<sub>2</sub> se révélait douloureuse dès une concentration de 50% (6, 20). La mise en évidence de ces problèmes a abouti à la recherche d'améliorations (16, 17, 28, 29, 30, 35, 53) et de techniques de remplacement (15, 17, 33, 42, 43, 44) mais pour le moment les différentes tentatives restent peu concluantes. Il semble qu'à la vue des derniers résultats l'utilisation d'une chambre à remplissage progressif serait préférable à celle d'une chambre pré remplie bien que des signes de détresse persistent malgré tout. Compte tenu des informations disponibles, l'ajout d'O<sub>2</sub> ne semble pas souhaitable (16, 17, 35). L'utilisation de l'argon (42, 43) tout comme la réalisation d'une anesthésie gazeuse (44, 48) préalable à une euthanasie au CO<sub>2</sub> restent des possibilités à explorer.

Dans la pratique, la technique d'euthanasie au CO<sub>2</sub> reste très utilisée notamment dans l'industrie pharmaceutique. Dans le cadre de ma thèse j'ai observé l'application de cette méthode dans le centre de recherche pharmacologique dans lequel j'ai effectué mon stage de fin d'études. J'ai essayé par l'étude de nouveaux appareils et la réalisation d'expériences d'optimiser la pratique de cette technique au sein de cette entreprise.

*Rapport-gratuit.com*   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

**DEUXIEME PARTIE :**

**OPTIMISATION DE LA TECHNIQUE D'EUTHANASIE  
PAR INHALATION DE CO<sub>2</sub> DANS UN CENTRE DE  
RECHERCHE PHARMACOLOGIQUE**



# I. Pratique de l'euthanasie par inhalation de CO<sub>2</sub> à l'IdRS

Dans le cadre de ma thèse j'ai effectué un stage dans un centre de recherche pharmacologique, l'Institut de Recherche Servier (IdRS). Dans ce centre, des euthanasies sont pratiquées dans un cadre expérimental. Le projet de l'étude que j'ai réalisée a été initié par le comité d'éthique du fait de la controverse relative à l'utilisation du CO<sub>2</sub>. Cette technique étant la principale technique d'euthanasie utilisée, il semblait important de visualiser ce qu'il en était en observant le comportement des rongeurs durant la réalisation de cette technique. L'idée était donc d'évaluer le degré de souffrance ressenti par les animaux et s'il y avait possibilité le cas échéant de modifier certains paramètres dans une optique d'amélioration. L'ensemble des expériences a été mené en accord avec le comité d'éthique.

## I.1. Etat des lieux

A l'heure actuelle, on compte dans ce centre, cinq appareils d'euthanasie au CO<sub>2</sub>. Trois de ces appareils sont des appareils Minerve® spécifiquement dédiés à l'euthanasie au CO<sub>2</sub>. Les deux autres appareils ont été fabriqués par le service de maintenance.

### I.1.1. Guéridon mobile MC2003 V03 Minerve® (cf. photographie 1)

Cet appareil présente trois cycles pré-réglés. L'arrivée du gaz se fait par le haut de manière progressive à un débit de 33 litres/minutes dans une enceinte de 50 litres soit 66%/minutes. La surface au sol est de 2400 cm<sup>2</sup>.

Il faut 90 secondes pour saturer l'enceinte.

En fonction des différents cycles, la phase de maintien est plus ou moins longue : 3 minutes 30 pour le cycle de 6 minutes, 5 minutes 30 pour le cycle de 8 minutes et 7 minutes 30 pour le cycle de 10 minutes.

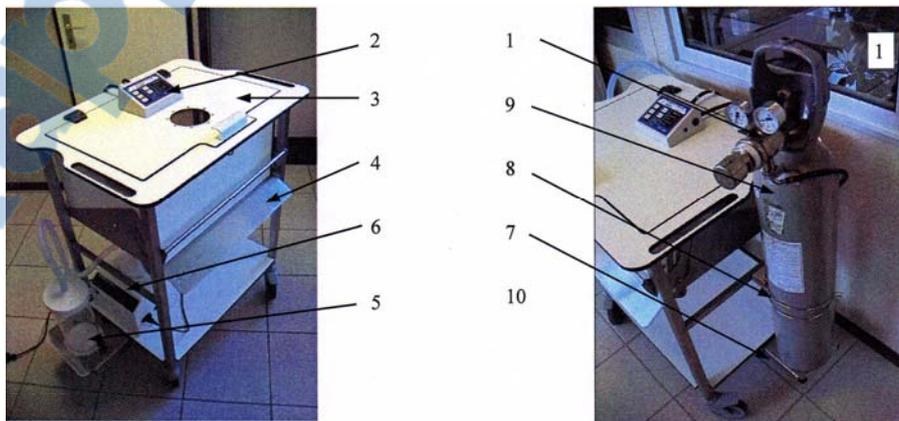
Enfin la phase d'extraction dure 60 secondes.

Le système d'extraction opère par deux orifices au milieu et en bas de la chambre d'euthanasie. Cet appareil présente un système de recapture du CO<sub>2</sub> par de la chaux sodée. La chaux est changée tous les 12 cycles (recommandations internes).

A la fin du cycle une sonnerie retentit indiquant à l'opérateur qu'il peut ouvrir pour récupérer les cadavres. La récupération s'effectue par un fond basculant peu pratique.

Ces appareils se trouvent dans des pièces dédiées à l'euthanasie.

### Photographie 1 : Guéridon mobile MC2003 V03 Minerve®



- |                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| - 1 Détendeur CO <sub>2</sub>       | - 6 Extracteur                              |
| - 2 Module de commande              | - 7 Plateau porte bouteille                 |
| - 3 Couvercle Supérieur avec hublot | - 8 Collier bouteille                       |
| - 4 Fond basculant                  | - 9 Bouteille CO <sub>2</sub> (non fournie) |
| - 5 Piège à CO <sub>2</sub>         |   |

### I.1.2. Appareils « maison »

Ces appareils sont réglés par un système de minuterie, le gaz arrive par le haut et est délivré à un débit inconnu pendant 3 minutes. Ces appareils ont un volume de 26 litres pour une surface au sol de 975 cm<sup>2</sup>. Il n'existe aucun système d'extraction.

Une des enceintes à euthanasie (A) est placée, dans la laverie, sous une hotte qui aspire le gaz lors de l'ouverture de l'enceinte. Avant la mise en place de la hotte, le détecteur à CO<sub>2</sub> se trouvant à proximité de l'appareil se déclenchait fréquemment. La localisation de cet appareil semble peu adaptée, en effet la laverie est une pièce bruyante avec beaucoup de passage.

L'autre enceinte (B) ne dispose pas d'une hotte, l'évacuation du CO<sub>2</sub> se fait directement dans la pièce. Cette pièce est dédiée à l'euthanasie.

Avant l'utilisation de l'appareil, un sac en plastique transparent est placé dans la boîte ce qui évite que celle-ci ne soit souillée et limite la manipulation des animaux morts.

Les différents avantages et inconvénients des appareils sont présentés dans le tableau 13 ci-dessous :

**Tableau 13 : Avantages et inconvénients des différents appareils utilisés à l'IdRS**

<b>Appareil</b>	<b>Utilisateurs</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
Minerve®	-Zootechniciens et -Expérimentateurs	-Sécurité du manipulateur maximale -Système de recapture du CO <sub>2</sub>	-Cycle long -Nombre d'animaux limité -Récupération des animaux difficile <sup>(*)</sup> -Nécessité de nettoyer l'enceinte entre chaque utilisation <sup>(*)</sup> -Nécessité de changer la chaux sodée régulièrement
Appareil « maison » A	-Zootechniciens	-Cycle court -Pas de manipulation des animaux morts -Pas de nettoyage de l'appareil entre chaque manipulation -Présence d'un détecteur de CO <sub>2</sub>	-Manque d'étanchéité au niveau du couvercle mais présence de la hotte -Nombre d'animaux limité
Appareil « maison » B	-Expérimentateurs	-Cycle court -Pas de manipulation des animaux morts -Pas de nettoyage de l'appareil entre chaque manipulation	-Manque d'étanchéité au niveau du couvercle -Absence de contrôle du taux de CO <sub>2</sub> dans le local (détecteur à O <sub>2</sub> ) -Nombre d'animaux limité

<sup>(\*)</sup>Le problème de récupération des animaux dans le système Minerve® a été résolu. Une cage à souris type II ou III est placée directement dans l'enceinte ce qui évite les souillures et la manipulation des animaux morts.

Le remplacement des appareils « maison » est envisagé, la problématique étant de trouver des appareils permettant la gestion de grands nombres d'animaux dans un temps raisonnable (15-20 minutes maximum) et réalisant une euthanasie la plus éthique possible. Dans ce but deux appareils ont été étudiés : un nouvel appareil de la société Minerve et un de la société TEM.

## I.2. Etude de nouveaux appareils

### I.2.1. Guéridon mobile MC2003 (nouvelle version) Minerve® (cf. photographie 2)

Cet appareil fonctionne de façon identique aux appareils déjà présents au centre de recherche. Son débit est également de 33 litres/minutes et ses cycles comprennent 3 phases (induction, maintien, extraction). A la fin de la phase d'induction, la chambre n'est saturée qu'à 80% contrairement aux autres appareils où la saturation est de 100%.

Le modèle qui nous intéresse comprend une enceinte de 120 litres soit une surface au sol de 4629 cm<sup>2</sup>. Dans la chambre, 3 cages de type E (450X300X200mm) peuvent être disposées résolvant ainsi le problème du nettoyage de l'enceinte et de la manipulation des animaux morts à la fin du cycle. Les cages utilisées devront être percées sur les côtés afin de permettre une extraction correcte du gaz.

La durée du cycle serait approximativement de 15 minutes.

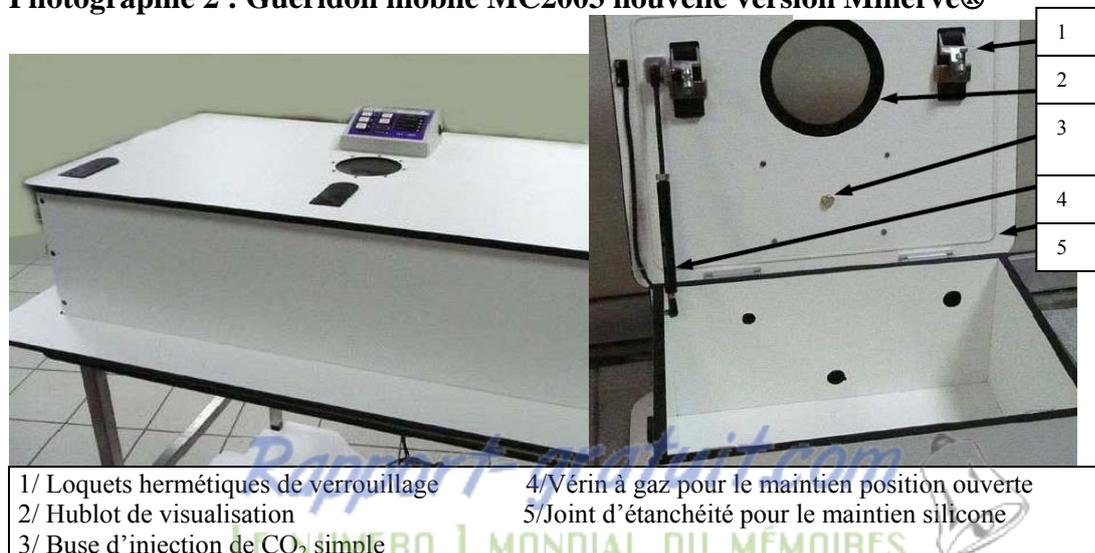
En fin de cycle un système de recapture du CO<sub>2</sub> par de la chaux sodée peut être utilisé mais il est également possible de brancher l'appareil sur l'extraction générale de la pièce.

Les différents avantages et inconvénients de ces appareils sont présentés dans le tableau 14 ci-dessous :

**Tableau 14 : Avantages et inconvénients de l'appareil Minerve®**

Avantages	Inconvénients
-Nombre d'animaux important -Absence de plateau à nettoyer : possibilité de mettre 3 cages (type E) percées. -Plus de manipulation des animaux morts -Sécurité du manipulateur	-Changement encore plus fréquent de la chaux sodée (5 cycles) -Cycles plus long -Nettoyage des cages -Répartition et extraction correcte du CO <sub>2</sub> ?

**Photographie 2 : Guéridon mobile MC2003 nouvelle version Minerve®**



## I.2.2. Appareil TEM (cf. figure 5)

Cet appareil présente un fonctionnement différent des appareils Minerve : un cycle ne comprend pas 3 mais 5 phases. La première phase est une phase d'induction air et CO<sub>2</sub>, suivie d'une phase de maintien ; suit une phase d'euthanasie au CO<sub>2</sub> poursuivie par une phase de maintien et enfin le cycle se termine par une phase d'extraction.

Le débit des gaz peut être réglé en fonction du souhait des opérateurs. Pour 10 cages à capacité minimale d'alimentation le cycle dure 32 minutes. Les portes sont verrouillées jusqu'à la fin du cycle.

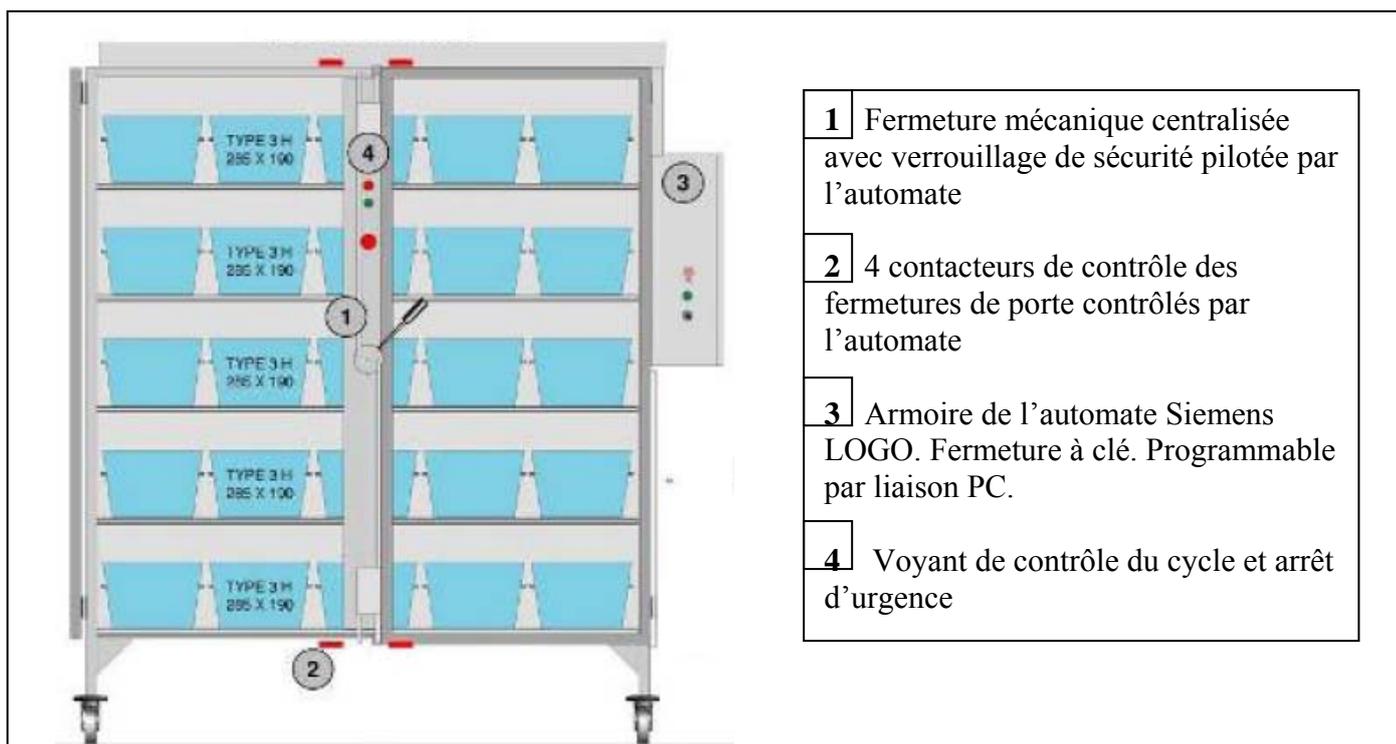
Cet appareil a la particularité de se présenter comme une armoire dans laquelle on peut placer directement les cages des animaux. La taille de l'appareil peut être adaptée à la demande du client. Compte tenu du volume d'animaux à sacrifier à l'IdRS, une enceinte de 440 litres avec 10 cages qui pourrait être séparée en deux compartiments lors du sacrifice d'un faible nombre d'animaux est envisageable. Pour 10 cages de type 3 H la surface au sol est de 8470 cm<sup>2</sup>.

Les différents avantages et inconvénients sont présentés dans le tableau 15 ci-dessous :

**Tableau 15 : Avantages et inconvénients de l'appareil TEM**

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Nombre d'animaux important (10 cages)</li> <li>-Limitation du stress car les animaux ne changent pas de cage</li> <li>-Phase d'induction CO<sub>2</sub> + Air?</li> <li>-Sécurité du manipulateur</li> <li>-Plusieurs arrivées de CO<sub>2</sub> (16)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Cycles plus longs.</li> <li>-Consommation de CO<sub>2</sub> importante</li> <li>-Nettoyage des cages</li> </ul>

**Figure 5 : Armoire à euthanasie TEM**



- 1** Fermeture mécanique centralisée avec verrouillage de sécurité pilotée par l'automate
- 2** 4 contacteurs de contrôle des fermetures de porte contrôlés par l'automate
- 3** Armoire de l'automate Siemens LOGO. Fermeture à clé. Programmable par liaison PC.
- 4** Voyant de contrôle du cycle et arrêt d'urgence

**Tableau 16 : Tableau récapitulatif des caractéristiques des différents appareils :**

<b>Appareils actuellement utilisés</b>		<b>Nouveaux appareils</b>	
Appareil A	Appareil B	Guéridon mobile MC2003 (Nouvelle version) Minerve®	Armoires à euthanasie TEM
<p>Guéridon mobile MC2003 version V03 Minerve®</p> <p>-Volume : 50L</p> <p>-Surface au sol : 2400cm<sup>2</sup></p> <p>-3 cycles pré réglés</p> <p>-Phase de remplissage : 90s</p> <p>Débit : 33L /min</p> <p>Saturation : 100%</p> <p>-Phase de maintien :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● cycle de 6 min : 3min30</li> <li>● cycle de 8min : 5min30</li> <li>● cycle de 10 min : 7min30</li> </ul> <p>-Phase d'extraction : 60s</p> <p>-Système de recapture : chaux sodée changée tous les 12 cycles ou brancher sur extraction</p> <p>-Sonnerie en fin de cycle</p>	<p>Appareil B</p> <p>-Volume : 26L</p> <p>-Surface au sol : 975 cm<sup>2</sup></p> <p>-Minuterie : 3 min</p> <p>-Pas de système de recapture</p> <p>-Pas de système de recapture, appareil mis sous hotte branchée sur extraction générale.</p> <p>-Détecteur à CO<sub>2</sub></p>	<p>Guéridon mobile MC2003 (Nouvelle version) Minerve®</p> <p>-Volume : 120L (possibilité de mettre 3 cages de type E percées)</p> <p>-Surface au sol : 4629 cm<sup>2</sup></p> <p>-3 cycles pré réglés</p> <p>-Phase de remplissage : 3min</p> <p>Débit : 33L/min</p> <p>Saturation : 80%</p> <p>-Phase de maintien :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● cycle de 6 min : 3min30</li> <li>● cycle de 8min : 5min30</li> <li>● cycle de 10 min : 7min30</li> </ul> <p>-Phase d'extraction : 90s</p> <p>-Système de recapture : chaux sodée changée tous les 5 cycles environ ou brancher sur extraction générale</p> <p>-Sonnerie en fin de cycle</p>	<p>Armoires à euthanasie TEM</p> <p>-Volume : pour 10 cages avec deux compartiments. 440L pour 25 cages : 1090L</p> <p>-Surface au sol : 10 cages de 38.5X22 cm=847 cm<sup>2</sup> soit 8470 cm<sup>2</sup> pour 25 cages : 21175 cm<sup>2</sup></p> <p>-cycle pré réglé</p> <p>5 étapes modulables et indépendantes : pour 25 cages à capacité minimale d'alimentation</p> <p>-Induction par Hypoxie (Air + CO<sub>2</sub>) : 5 min 30</p> <p>-Maintenance de l'induction : 30s</p> <p>-Euthanasie CO<sub>2</sub> pur : 11 min</p> <p>-Maintenance euthanasie : 4 min</p> <p>-Extraction CO<sub>2</sub> : 11 min</p> <p>Durée totale : 32 min</p> <p>-Verrouillage des portes jusqu'à la fin du cycle</p>

### **I.3. Conclusion**

Au sein de l'IdRS, dans l'attente du changement des appareils « maison », la pratique de l'euthanasie au CO<sub>2</sub> peut être améliorée.

L'appareil localisé dans la laverie devrait être déplacé dans une pièce, moins bruyante, dédiée à l'euthanasie. L'autre appareil devrait être équipé d'une hotte afin d'extraire le gaz et un détecteur à CO<sub>2</sub> devrait être installé à proximité afin de garantir une sécurité optimale de l'opérateur.

L'appareil Minerve et l'appareil TEM étudiés dans le cadre du changement des appareils maison semblent tous deux convenir aux besoins actuels de l'entreprise. L'appareil TEM présente toutefois l'avantage d'être plus facilement réglable. Cet appareil permet également l'euthanasie d'un nombre d'animaux plus important. L'induction air / CO<sub>2</sub> et la pratique de l'euthanasie dans la cage d'hébergement des animaux sont des concepts intéressants mais n'ayant pas eu l'occasion de voir fonctionner cet appareil il m'est difficile de conclure sur leur réel intérêt.

## II. Partie expérimentale

### II.1. Objectif

L'objectif de cette étude est d'améliorer la pratique de l'euthanasie au CO<sub>2</sub>. Compte tenu des contraintes de temps, techniques et matérielles, il a été nécessaire de se limiter. Il a été décidé sur la base des recherches bibliographiques (Cf. Partie I), d'étudier dans un premier temps l'effet de différents débits de CO<sub>2</sub> pour induire l'euthanasie. Le débit semble en effet avoir un impact sur le bien-être. J'ai donc recherché le débit de CO<sub>2</sub> paraissant causer le moins d'effets aversifs sur la base d'observations comportementales, du temps nécessaire à induire la perte de conscience et l'arrêt respiratoire.

Dans un deuxième temps des expériences ont été pratiquées sur différentes souches de souris, NMRI et C57Bl6 afin de mettre en évidence un éventuel effet souche, sur des souris seules ou par deux afin de détecter un éventuel effet nombre.

Dans un troisième temps des expériences préliminaires ont été réalisées chez le rat afin de mettre en évidence d'éventuelles différences comportementales chez cette espèce par rapport aux souris.

Le résultat de ces expériences devraient, à terme, permettre de paramétrer les nouveaux appareils à euthanasie de façon à réduire le risque de souffrance.

### II.2. Tests préliminaires

#### II.2.1. Objectifs

Le but de ces essais préliminaires était, dans un premier temps, de visualiser ce qui se passait concrètement dans l'appareil Minerve® pendant l'euthanasie. Dans un deuxième temps, le but était de déterminer les paramètres susceptibles d'être étudiés et d'approximer les temps nécessaires à induire l'immobilité et l'arrêt respiratoire.

#### II.2.2. Méthodes

Trois essais préliminaires ont été réalisés. Ils ont été réalisés sur un des guéridons mobiles MC2003 V03 Minerve®. Les souris étaient placées dans une cage de type II dans l'enceinte.

Ces essais ont été effectués sur des souris C57Bl6 devant être euthanasiées.

#### II.2.3. Résultats

**Tableau 17 : Différents paramètres étudiés lors de l'euthanasie de souris C57 dans l'appareil à euthanasie Minerve®**

		Immobilité (en s)	Arrêt respiratoire (en s)	Mictions	Défécations
Essai 1	Souris 1	36	93	2	2
	Souris 2	37	105		
	Souris 3	37	102		
	Souris 4	31	97		
Essai 2	Souris 1	37	104	1	3
	Souris 2	37	96		
	Souris 3	41	94		
Essai 3	Souris 1	35	105	1	1
	Souris 2	35	104		
	Souris 3	28	103		
	Souris 4	25	101		
Moyennes		34,4	100,4		

Le temps moyen nécessaire à induire l'immobilité est supérieur à 30 secondes et celui nécessaire à induire l'arrêt respiratoire est supérieur à 1 minute 30.

Observations comportementales :

L'arrivée du CO<sub>2</sub> produit une grande agitation des souris : lors du premier essai une souris a sauté hors de la cage placée dans l'enceinte à euthanasie ; lors du deuxième essai deux souris sont également sorties de la cage.

Au cours du cycle, plusieurs souris ont montré des signes de détresse respiratoire (tête vers le haut et l'arrière comme pour chercher de l'air, tachypnée, halètement...).

Ces premiers tests ont permis de définir les conditions expérimentales des expériences 1, 2 et 3. (Cf. II.3.)

## II.3. Matériel et méthode

### II.3.1. Matériel

Lors des expériences, une paillasse mobile pour anesthésie à isoflurane TEM a été utilisée. Cet appareil a été choisi car il permettait grâce à son enceinte entièrement transparente de visualiser facilement le comportement des animaux pendant l'euthanasie.

Le poste a été modifié : un débitmètre à CO<sub>2</sub>, un détendeur et une bouteille de CO<sub>2</sub> de 10L ont été ajoutés afin de pouvoir faire varier facilement le débit de CO<sub>2</sub>.

Le détendeur a été réglé sur 2 bars.

L'extraction se faisait directement par le système d'extraction générale.

L'enceinte dans laquelle était placé l'animal a une capacité de 3,5L permettant l'euthanasie simultanée d'un faible nombre de souris (1 à 2 souris) et de rat (1 adulte).

### Photographie 3 : Paillasse mobile pour anesthésie à isoflurane TEM



## **II.3.2. Animaux**

Toutes les souris utilisées dans cette étude proviennent de différents protocoles réalisés par une division de neurologie : il s'agit d'animaux témoins ou traités qui ne présentaient pas de signes de souffrance en fin de manipulation, (sinon ils auraient été euthanasiés de manière anticipée par dislocation cervicale). Dans la procédure normale, ces souris sont euthanasiées au CO<sub>2</sub> en fin de manipulation, mais ici elles ont été hébergées dans un local avec température (21°C) et humidité contrôlée (50%). Un délai de 5 jours a été observé entre le moment de leur utilisation dans les protocoles et le moment d'utilisation dans cette étude. Ce délai est considéré comme suffisamment long pour que les traitements effectués dans les précédents protocoles n'interfèrent pas avec les résultats de cette étude.

### **II.3.2.1. Expérience n°1**

Souris Mâles

Souche : NMRI (Fournisseur : Janvier)

Poids moyen au moment de l'étude : 32g

Alimentation : souris NMRI : aliment A03 de chez Safe.

Les souris utilisées lors de la première et de la deuxième journée de manipulation ont préalablement été utilisées dans un protocole d'hypothermie induite. Ce protocole consiste en l'observation des effets d'un produit sur une hypothermie induite par l'administration d'apomorphine, de clonidine, d'oxotremorine ou de L-Dopa. Le synopsis d'administration des produits varie de 30 min avant l'administration de l'agent hypothermisant à une administration simultanée en fonction de leur durée d'action ou de l'effet recherché. Trois mesures de températures sont ensuite effectuées à 30 minutes d'intervalles.

Les souris utilisées lors de la troisième journée de manipulation ont préalablement été utilisées dans un protocole de suspension caudale. Ce protocole consiste en l'observation de souris suspendues par la queue pendant 6 minutes, et en la mesure de la durée totale d'immobilisation de l'animal (ainsi que de la puissance et de l'énergie totale). Ces souris ont préalablement reçu un antidépresseur, molécule diminuant le plus souvent la durée d'immobilisation. Le schéma d'administration varie en fonction des molécules et les souris reçoivent classiquement leur dernière administration 30 à 60 minutes avant le début de la manipulation.

Bilan :

Effectif journée de manipulation n°1 : 24/04/08 → 25 Souris

Effectif journée de manipulation n°2 : 29/04/08 → 30 souris

Effectif journée de manipulation n°3 : 21/05/08 → 30 souris

Au total 85 souris ont été utilisées dans cette expérience réalisée en 3 jours, réparties en 5 groupes de 17 souris.

### **II.3.2.2. Expérience n°2**

Souris Mâles

Souche : C57Bl (Fournisseur : Charles River)

Poids moyen au moment de l'étude : 20.1g

Alimentation : aliment R-Z (élevage) de chez Ssniff.

Les souris utilisées dans cette étude ont été utilisées dans un protocole de mise au point d'une division de neurologie. Dans cette division les protocoles consistent pour leur grande majorité en des tests comportementaux (labyrinthe) réalisés suite à l'administration de produit de référence et de produit issus de la recherche.

Effectif : 27/05/08 → 30 Souris

Au total 30 souris ont été utilisées dans cette expérience réalisée sur une journée, réparties en 5 groupes de 6 souris.

### **II.3.2.3. Expérience n°3**

Souris Mâles

Souche : NMRI (Fournisseur : Janvier)

Poids moyen au moment de l'étude : 35g

Alimentation : aliment A03 de chez Safe.

Le protocole consiste à observer les propriétés antalgiques d'un produit sur des crampes abdominales induites par de la PBQ (Phényl-p-Quinone ou Phényl-p-benzoquinone) à 0.25%.

Effectif : 05/06/08 → 40 souris

Au total 40 souris ont été utilisées dans cette expérience réalisée sur une journée, réparties en 5 groupes de 8 souris.

Lors de cette expérience, les souris sont étudiées par groupe de deux.

### **II.3.3. Méthode**

Les souris sont placées individuellement ou par deux dans l'enceinte, puis l'arrivée de gaz est ouverte. Différents débits de gaz ont été utilisés : 1L/min, 1,5L/min, 2,25L/min, 2,75L/min soit respectivement : 27%/min, 43%/min, 64%/min, 77%/min. Certaines souris (témoins) sont placées 3 minutes dans l'enceinte afin d'observer le comportement de la souris en l'absence de CO<sub>2</sub> puis elles sont euthanasiées au CO<sub>2</sub>.

#### **II.3.3.1. Procédure**

*Avant de commencer :*

-Démarrer le compresseur

-Ouvrir la bouteille de CO<sub>2</sub> et s'assurer que le détendeur indique 2 bars.

*Expérience :*

-Régler le débitmètre en mettant ses yeux à la hauteur du trait

-Placer la souris dans la boîte

-Au bout de 5 secondes ouvrir le robinet

-Attendre encore deux minutes après l'arrêt respiratoire avant de descendre le débitmètre sur 0 et de fermer le robinet

-Déclencher l'extraction pendant une minute

-Sortir la souris, la placer dans un sac plastique après s'être assuré que son cœur ne bat plus

-Nettoyer les souillures (crottes, litière, urine) puis nettoyer avec du Phagogermyl®

*A la fin des manipulations :*

-Fermer la bouteille de CO<sub>2</sub>

-Arrêter le compresseur

-Purger le compresseur

-Placer les cadavres dans le congélateur

### II.3.3.2. Paramètres d'intérêt

Dans l'expérience n°1 les paramètres suivants sont évalués.

-Signes de détresse : la détresse chez le rongeur étant difficile à évaluer, il a été décidé au vu des essais préliminaires de ne considérer que les sauts comme des signes de détresse (les souris témoins ne sautant jamais).

-Mesure du temps nécessaire à induire une immobilité totale de l'animal: Ce temps a été choisi pour tenter d'approcher celui nécessaire à induire la perte de conscience, difficile à déterminer sur la base d'observations comportementales. Des essais ont été réalisés afin de s'assurer que ce temps permettait effectivement d'approcher le temps nécessaire à induire la perte de conscience. Pour cela, des souris ont été sorties de l'enceinte à euthanasie juste après l'immobilité. A ce stade, les souris n'étaient pas inconscientes : elles réagissaient toutes au réflexe de pincement de la patte quel que soit le débit de CO<sub>2</sub> utilisé. Ce test a été répété avec une sortie de la souris à « Immobilité + 20 secondes » (I+20s) et « Immobilité + 30 secondes » (I+30s) ; il s'est avéré qu'à I+20s presque toutes les souris répondaient au pincement de patte alors qu'à I+30s aucune ne réagissait. Le temps nécessaire à induire la perte de conscience pourrait donc être approché par I+30s.

-Mesure du temps nécessaire à induire l'arrêt respiratoire : On considère ici que le moment de l'arrêt respiratoire correspond au moment de la mort de la souris.

-Défécations

-Mictions

Dans l'expérience n°2 :

-Les temps nécessaires à induire l'immobilité, l'arrêt respiratoire et le nombre de souris ayant fait au moins un saut ont été étudiés.

Dans l'expérience n°3 :

-Les temps nécessaires à induire l'immobilité et l'arrêt respiratoire ont été étudiés.

Le nombre de souris ayant fait au moins un saut n'a pas pu être pris en compte car les témoins sautaient également : ce paramètre ne permettait donc plus d'évaluer la détresse liée à l'inhalation de CO<sub>2</sub>.

### II.3.4. Statistiques

Le calcul de N, effectif pour chacun des 5 groupes (4 débits différents + groupe témoin), a été réalisé d'après les premières données pour l'expérience n°1 (N=17).

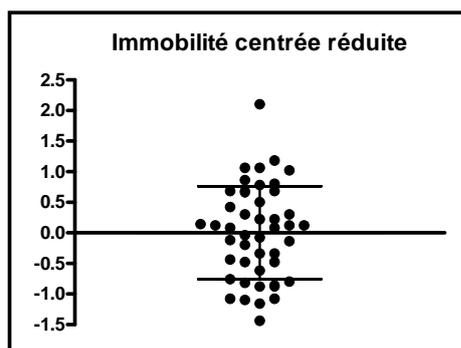
Pour l'expérience n°2 et l'expérience n°3, le nombre d'animaux est lié à des contraintes techniques (temps, disponibilité d'animaux).

L'ordre des essais a été déterminé aléatoirement à l'aide d'une table de randomisation à 5 éléments (4 débits différents + les témoins).

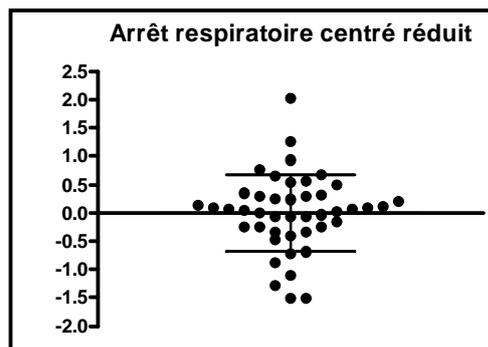
Les 5 paramètres d'intérêt de l'expérience n°1 peuvent être répartis en 2 groupes :

- le temps nécessaire à induire l'immobilité et l'arrêt respiratoire qui sont des paramètres quantitatifs présentant une distribution normale. La répartition normale de ces deux paramètres a été vérifiée d'après les premières données en calculant les valeurs d'immobilité et d'arrêt respiratoire centrées réduites (cf. figures 6 et 7).
- la présence ou l'absence de saut, de défécation, de miction qui sont des paramètres qualitatifs.

**Figure 6 : Immobilité centrée réduite d'après les données des 2 premiers jours de manipulation**



**Figure 7 : Arrêt respiratoire centré réduit d'après les données des 2 premiers jours de manipulation**



Ces deux types de paramètre ne sont pas traités avec les mêmes tests statistiques. Les paramètres quantitatifs ont été traités à l'aide de test paramétrique : test ANOVA 1 facteur suivi d'un test de Tukey (comparaison des différents groupes deux à deux), ainsi qu'un test de corrélation (58). Un test ANOVA à 2 facteurs a également été utilisé pour détecter une éventuelle influence du jour de manipulation sur le temps nécessaire à induire l'immobilité et l'arrêt respiratoire (cf. figures 10 et 11) (58). Pour les paramètres qualitatifs, un test non paramétrique a été utilisé : Chi-2 (Chi-square) (52).

Le risque  $\alpha$  est pris à 5%.

Pour l'expérience n°2, les paramètres étudiés pouvaient également être répartis en 2 groupes.

Les paramètres quantitatifs (temps nécessaire à induire l'immobilité et l'arrêt respiratoire) ont été analysés avec un test paramétrique ANOVA à 2 facteurs (concentration, souche) suivi d'un test de Bonferroni (comparaison des différents groupes deux à deux) (58).

Le nombre de souris ayant fait un saut a été analysé par un test non paramétrique : Chi-2 (Chi-square) (52).

Pour l'expérience n°3 :

La variabilité des paramètres étant très faible entre les souris d'une même cage par rapport à la variabilité des paramètres entre les souris d'essais différents (cf. figures 8 et 9), les paramètres ont été exprimés en ne considérant que leur moyenne par cage.

Ils ont ensuite été analysés avec un test paramétrique ANOVA à 2 facteurs (concentration, nombre) suivi d'un test de Bonferroni (comparaison des différents groupes deux à deux) (58).

Figure 8 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'immobilité en fonction du débit de CO<sub>2</sub> par essai et par cage

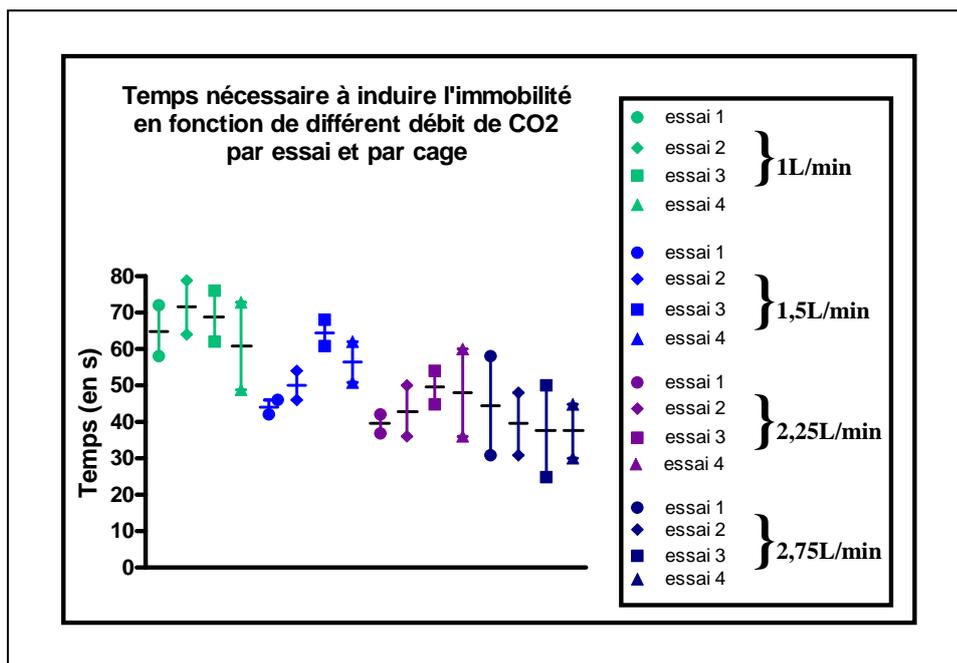
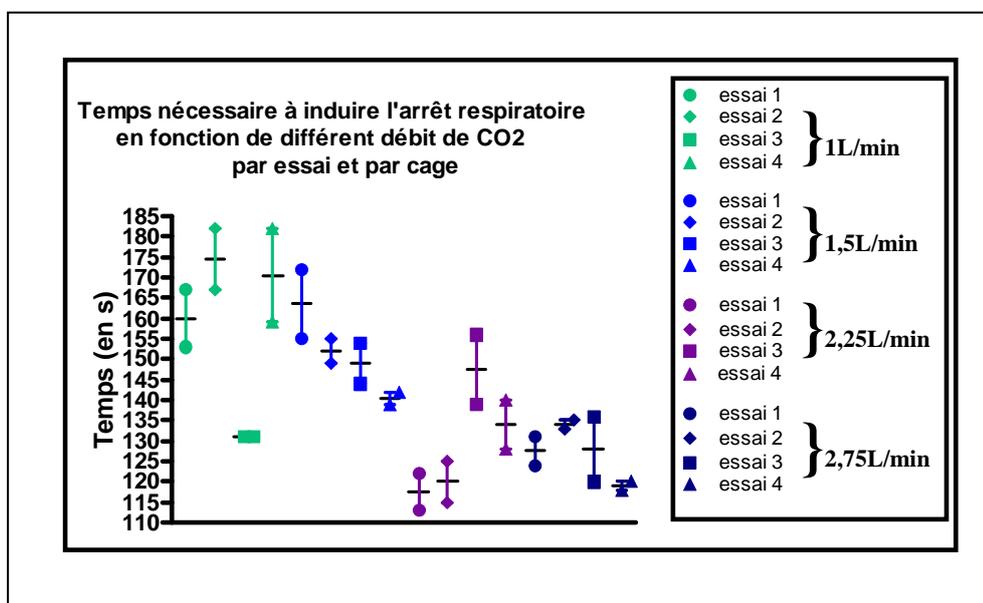


Figure 9 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'arrêt respiratoire en fonction du débit de CO<sub>2</sub> par essai et par cage



## II.4. Résultats

### II.4.1. Expérience n°1

Les données brutes figurent ci-dessous (cf. tableaux 18 et 19).

**Tableau 18 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'immobilité chez la souris NMRI en fonction du débit de CO<sub>2</sub> (Expérience 1, N=17)**

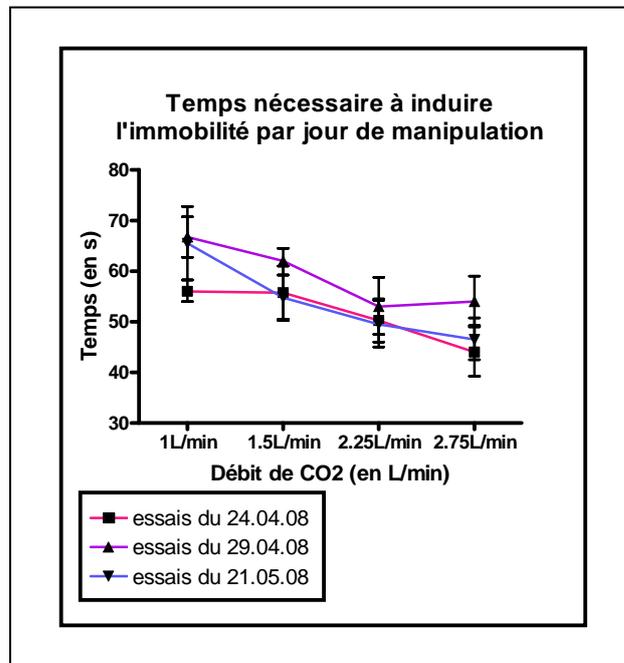
		1L/min	1,5 L/min	2,25L/min	2,75 L/min	Témoins
24.04.08	Essai 1	58	67	65	32	/
	Essai 2	62	66	45	38	/
	Essai 3	51	45	42	39	/
	Essai 4	58	42	44	56	/
	Essai 5	51	58	55	55	/
29.04.08	Essai 6	53	50	42	51	/
	Essai 7	74	69	54	53	/
	Essai 8	72	63	65	59	/
	Essai 9	74	61	35	58	/
	Essai 10	56	65	50	51	/
	Essai 11	71	63	72	37	/
21.05.08	Essai 12	53	53	34	54	/
	Essai 13	78	65	57	33	/
	Essai 14	57	46	37	61	/
	Essai 15	82	57	56	43	/
	Essai 16	40	39	52	47	/
	Essai 17	82	68	61	41	/
	Moyenne	<b>63,1</b>	<b>57,5</b>	<b>50,9</b>	<b>47,5</b>	/

**Tableau 19 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'arrêt respiratoire chez la souris NMRI en fonction du débit de CO<sub>2</sub> (Expérience 1, N=17)**

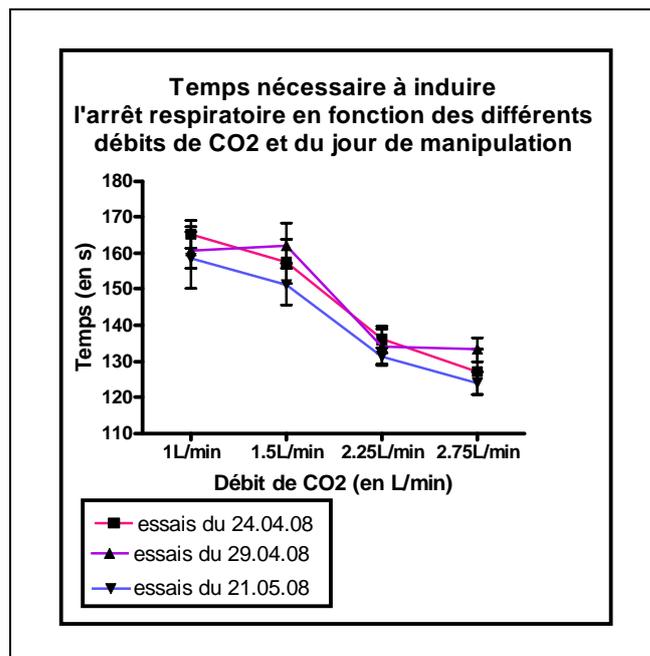
		1L/min	1,5 L/min	2,25L/min	2,75 L/min	Témoins
24.04.08	Essai 1	164	142	131	124	/
	Essai 2	167	170	129	136	/
	Essai 3	187	145	151	127	/
	Essai 4	176	167	132	139	/
	Essai 5	167	160	134	113	/
29.04.08	Essai 6	173	178	135	135	/
	Essai 7	166	178	136	126	/
	Essai 8	167	158	154	136	/
	Essai 9	160	137	126	144	/
	Essai 10	139	161	179	122	/
	Essai 11	161	174	137	136	/
21.05.08	Essai 12	170	152	128	123	/
	Essai 13	166	146	137	116	/
	Essai 14	135	144	139	127	/
	Essai 15	192	133	126	137	/
	Essai 16	146	173	132	123	/
	Essai 17	143	160	125	117	/
	Moyenne	<b>163,5</b>	<b>157,5</b>	<b>137,1</b>	<b>128,3</b>	/

Dans un premier temps, l'hypothèse d'une éventuelle influence des jours de manipulation a été exclue en ce qui concerne le temps nécessaire à induire l'immobilité et l'arrêt respiratoire (cf. figures 10 et 11).

**Figure 10 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'immobilité chez la souris NMRI en fonction des différents débits de CO<sub>2</sub> et des jours de manipulation d'après les données du tableau 18** (Expérience 1, N=17)

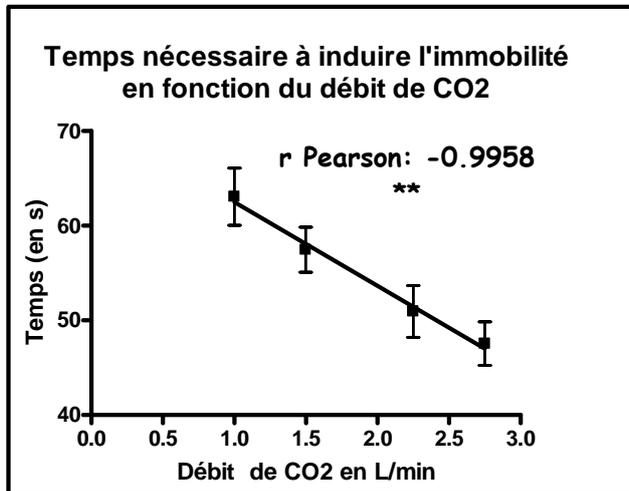


**Figure 11 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'arrêt respiratoire chez la souris NMRI en fonction des différents débits de CO<sub>2</sub> et des jours de manipulation d'après les données du tableau 19** (Expérience 1, N=17)

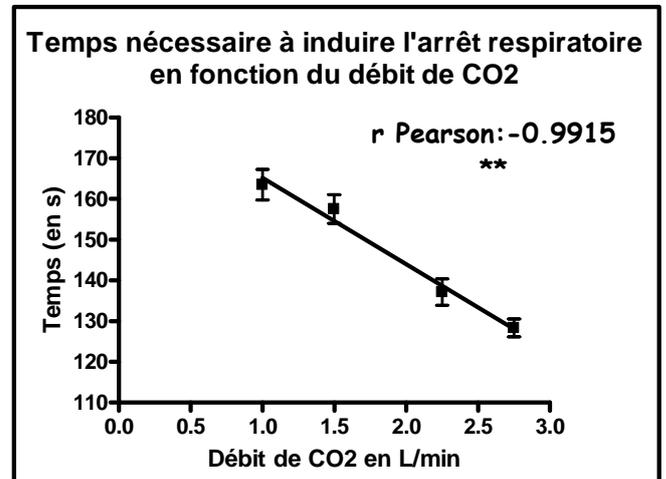


On observe que plus le débit de CO<sub>2</sub> est important, plus le temps nécessaire à induire l'immobilité et l'arrêt respiratoire est faible.

**Figure 12 : Corrélation entre le temps (en secondes) nécessaire à induire l'immobilité et le débit de CO<sub>2</sub>** (Expérience 1, N=17)

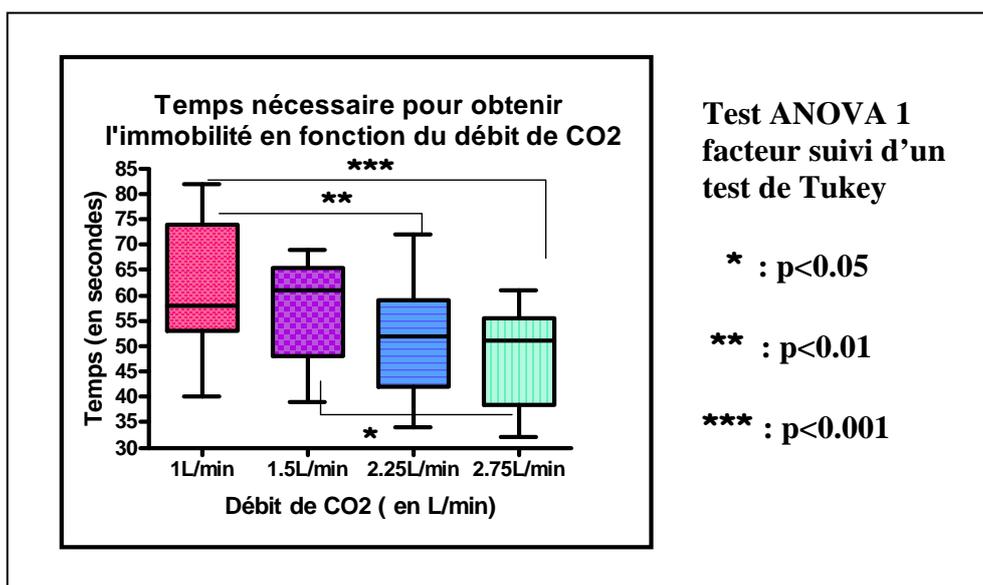


**Figure 13 : Corrélation entre le temps (en secondes) nécessaire à induire l'arrêt respiratoire et le débit de CO<sub>2</sub>** (Expérience 1, N=17)

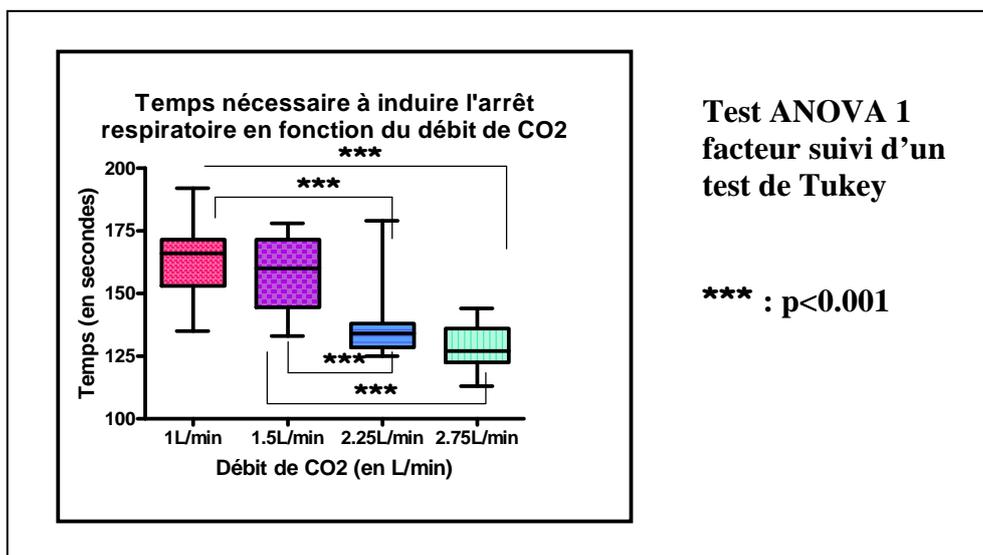


Ces temps se révèlent significativement différents pour des débits de CO<sub>2</sub> de 1L/min versus 2,75L/min, 1L/min versus 2,25L/min et 1,5L/min versus 2,75L/min pour le temps nécessaire à induire l'immobilité et pour des débits de 1L/min et 1,5L/min versus 2,25L/min et 2,75L/min pour le temps nécessaire à induire l'arrêt respiratoire. Même pour le débit le plus élevé, ces temps sont longs, le temps moyen nécessaire à induire l'immobilité est de 47,5 secondes et le temps moyen nécessaire à induire l'arrêt respiratoire est de 128 secondes (*cf.* tableaux 18 et 19 et figures 14 et 15).

**Figure 14 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'immobilité chez la souris NMRI en fonction des différents débits de CO<sub>2</sub>** d'après les données du tableau 18 (Expérience 1, N=17)



**Figure 15 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'arrêt respiratoire chez la souris NMRI en fonction des différents débits de CO<sub>2</sub> d'après les données du tableau 19 (Expérience 1, N=17)**



En ce qui concerne les signes de détresse, on observe une différence significative du nombre de souris ayant fait au moins un saut entre le débit le plus faible et le débit le plus élevé, 9 souris sur 17 ont au moins fait un saut pour le débit de 1L/min contre 2 sur 17 pour le débit de 2,75L/min (cf. tableau 20).

**Tableau 20 : Nombre de souris ayant effectué au moins un saut en fonction des différentes concentrations de CO<sub>2</sub> (Expérience 1, N=17)**

		1L/min	1,5L/min	2,25L/min	2,75L/min	Témoins
24.04.08	Essai 1	1				/
	Essai 2	1	1			/
	Essai 3			1		/
	Essai 4					/
	Essai 5					/
29.04.08	Essai 6	1	1	1		/
	Essai 7	1				/
	Essai 8	1			1	/
	Essai 9	1	1			/
	Essai 10		1	1	1	/
	Essai 11					/
21.05.08	Essai 12	1				/
	Essai 13	1		1		/
	Essai 14					/
	Essai 15	1				/
	Essai 16					/
	Essai 17					/
	Nombre de souris ayant fait au moins un saut	9	4	4	2	/

Un nombre de défécation significativement plus important est observé entre les souris n'ayant pas été en contact avec du CO<sub>2</sub> et celles ayant été euthanasiées par inhalation de CO<sub>2</sub>.

**Tableau 21 : Nombre de souris ayant déféqué durant leur présence dans l'enceinte à euthanasie en fonction des différents débits de CO<sub>2</sub>** (Expérience 1, N=17)

	1L/min	1,5L/min	2,25L/min	2,75L/min	Témoins
24.04.08	1	/	/	/	4
29.04.08	1	1	1	/	4
21.05.08	/	2	1	/	1
Nombre total de souris ayant déféqué	2	3	2	/	9

Un nombre de miction significativement plus important est observé entre les souris ayant été euthanasiées par inhalation de CO<sub>2</sub> et celles n'ayant pas été en contact ce gaz. Ces mictions se produisaient juste avant la mort.

**Tableau 22 : Nombre de souris ayant uriné durant leur présence dans l'enceinte à euthanasie en fonction des différents débits de CO<sub>2</sub>** (Expérience 1, N=17)

	1L/min	1,5L/min	2,25L/min	2,75L/min	Témoins
24.04.08	5	5	3	4	1
29.04.08	6	6	6	5	/
21.05.08	5	5	4	5	4
Nombre total de souris ayant uriné	16	16	13	14	5

#### II.4.2. Expérience n°2

Les données brutes figurent ci-dessous (*cf.* tableaux 23 et 24).

**Tableau 23 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'immobilité chez la souris C57 en fonction du débit de CO<sub>2</sub>** (Expérience 2, N=6)

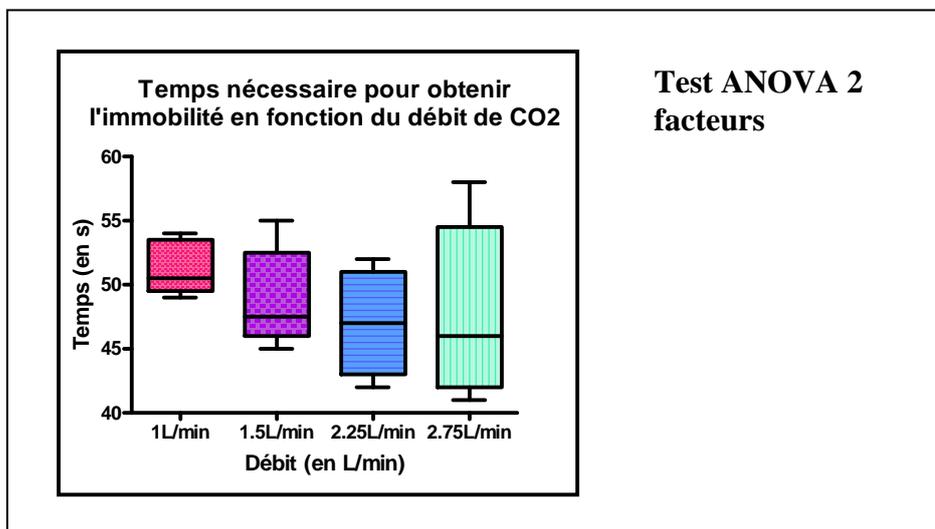
	1L/min	1,5L/min	2,25L/min	2,75L/min	Témoins
Essai 1	50	45	50	43	/
Essai 2	54	55	46	41	/
Essai 3	50	50	48	46	/
Essai 4	49	48	42	58	/
Essai 5	51	47	52	51	/
Essai 6	53	47	44	46	/
Moyenne	<b>51,2</b>	<b>48,7</b>	<b>47</b>	<b>47,5</b>	/

**Tableau 24 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'arrêt respiratoire chez la souris C57 en fonction du débit de CO<sub>2</sub>** (Expérience 2, N=6)

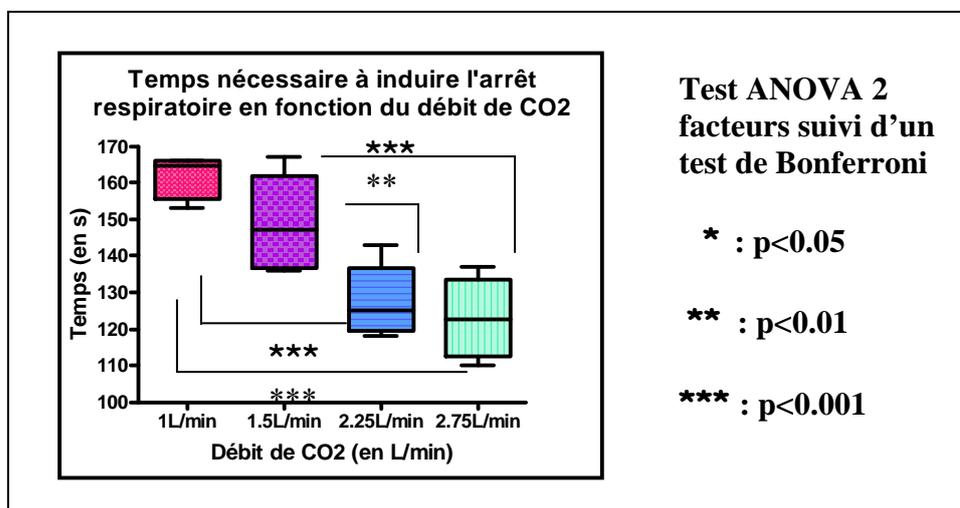
	1L/min	1,5L/min	2,25L/min	2,75L/min	Témoins
Essai 1	165	136	127	115	/
Essai 2	164	167	130	130	/
Essai 3	153	137	121	115	/
Essai 4	166	157	118	130	/
Essai 5	166	149	143	137	/
Essai 6	158	145	123	110	/
Moyenne	<b>162</b>	<b>148,5</b>	<b>127</b>	<b>122,8</b>	/

Les temps nécessaires à induire l'immobilité ne se révèlent pas différents pour les différents débits de CO<sub>2</sub>. Les temps nécessaires à induire l'arrêt respiratoire se révèlent significativement différents pour des débits de CO<sub>2</sub> de 1L/min versus 2,75L/min, 1L/min versus 2,25L/min, 1,5L/min versus 2,25L/min et 1,5L/min versus 2,75L/min (cf. tableaux 23 et 24 et figures 16 et 17).

**Figure 16 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'immobilité chez la souris C57 en fonction des différents débits de CO<sub>2</sub> d'après les données du tableau 23 (Expérience 2, N=6)**



**Figure 17 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'arrêt respiratoire chez la souris C57 en fonction des différents débits de CO<sub>2</sub> d'après les données du tableau 24 (Expérience 2, N=6)**



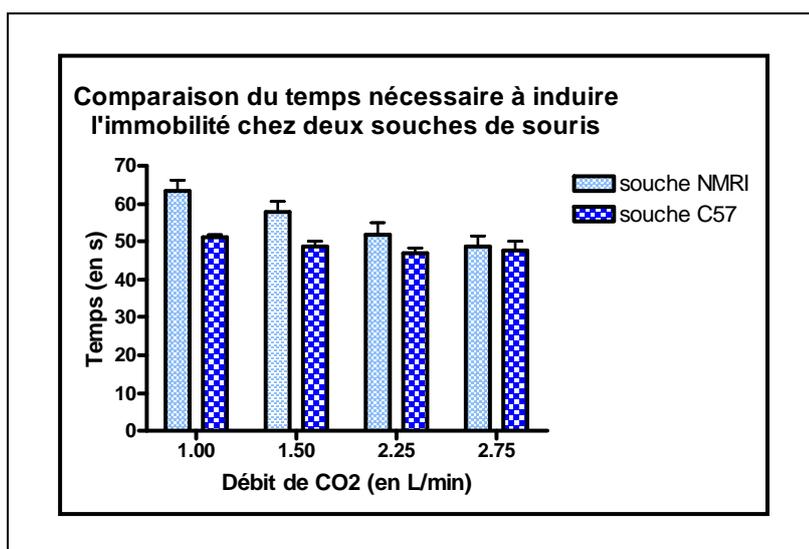
Aucune souris C57 n'a effectué de saut au cours de l'euthanasie, quel que soit le débit utilisé.

### II.4.3. Expérience n°2 versus expérience n°1

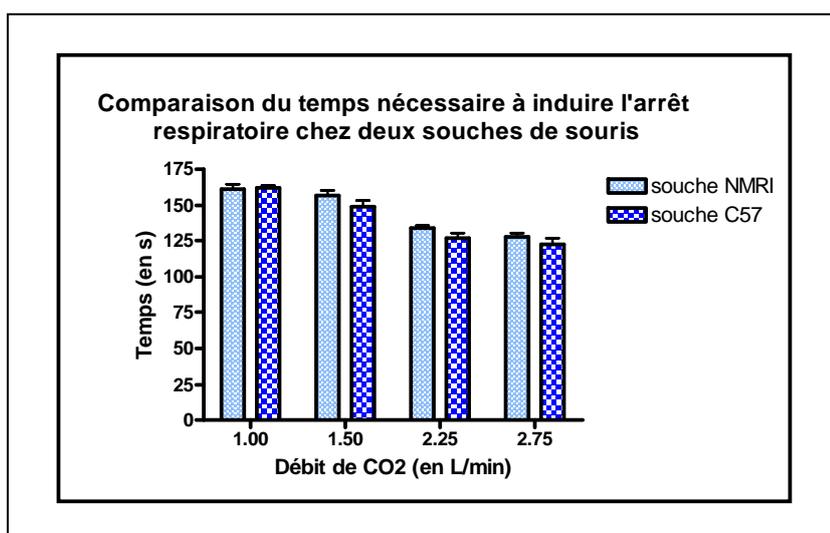
Aucune différence significative n'est observée entre le temps nécessaire à induire l'immobilité et le temps nécessaire à induire l'arrêt respiratoire chez les souris C57 (20g) et les souris NMRI (32g).

A la vue des valeurs, le temps nécessaire à induire l'immobilité semble varier plus que celui nécessaire à induire l'arrêt respiratoire. Le temps nécessaire à induire l'immobilité tend à être plus court pour les concentrations faibles chez les C57 que chez les NMRI. Il serait intéressant de refaire cette expérience avec un nombre de souris C57 plus important (cf. figures 16 et 17).

**Figure 18 : Comparaison du temps (en secondes) nécessaire à induire l'immobilité chez des souris NMRI et C57 d'après les données des tableaux 18 et 23**



**Figure19 : Comparaison du temps (en secondes) nécessaire à induire l'arrêt respiratoire chez des souris NMRI et C57 d'après les données des tableaux 19 et 24**



Concernant les signes de détresse chez les souris C57 aucun saut n'a été observé, ce qui est significativement différent de la souche NMRI pour les débit de 1L/min, 1,5L/min, 2,25L/min (cf. tableau 20).

#### II.4.4. Expérience n°3

Les données brutes figurent ci-dessous (cf. tableaux 25 et 26).

**Tableau 25 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'immobilité chez la souris NMRI euthanasiée par groupe de deux en fonction du débit de CO<sub>2</sub> (Expérience 3, N=8)**

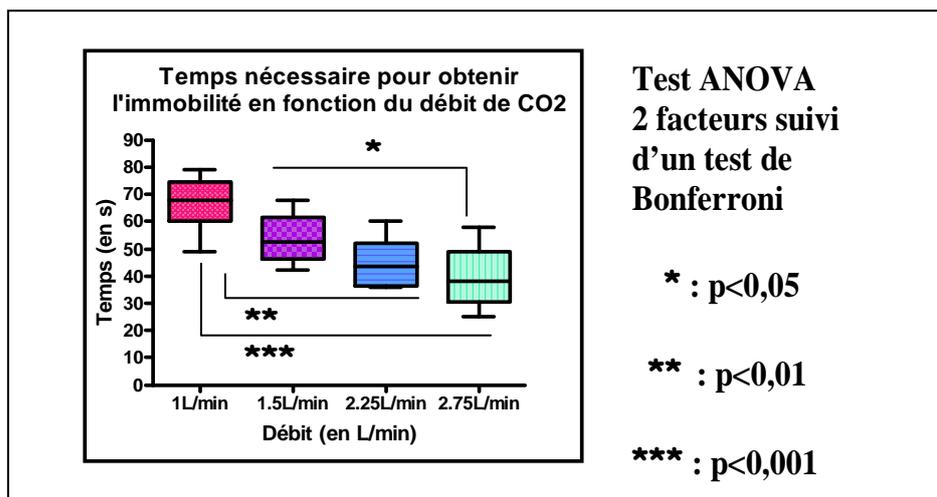
	1L/min	1,5L/min	2,25L/min	2,75L/min
Essai 1	58	42	37	31
	72	46	42	58
Essai 2	64	54	36	31
	79	46	50	48
Essai 3	76	61	45	25
	62	68	54	50
Essai 4	49	51	36	30
	73	62	60	45
Moyenne	<b>66,6</b>	<b>53,8</b>	<b>45</b>	<b>39,8</b>

**Tableau 26 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'arrêt respiratoire chez la souris NMRI euthanasiée par groupe de deux en fonction du débit de CO<sub>2</sub> (Expérience 3, N=8)**

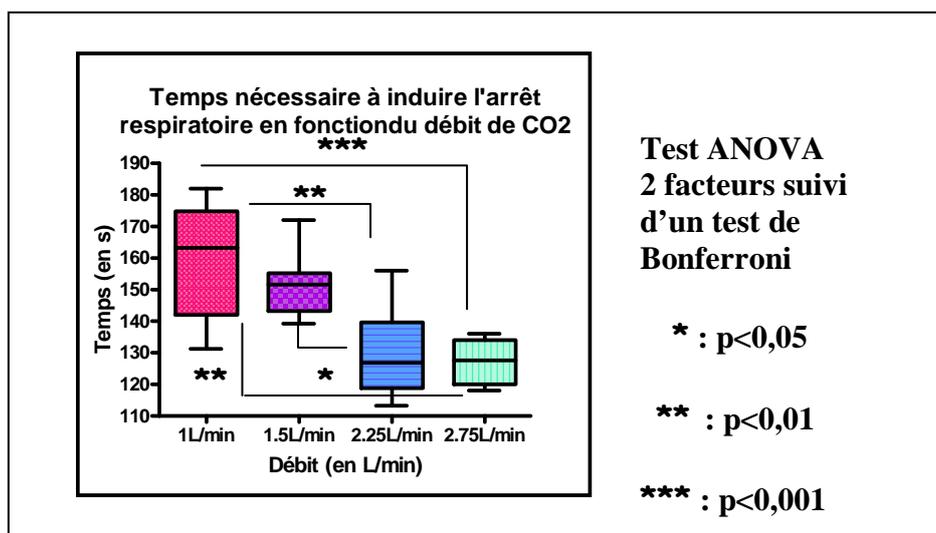
	1L/min	1,5L/min	2,25L/min	2,75L/min
Essai 1	167	155	113	131
	153	172	122	124
Essai 2	167	155	125	135
	182	149	115	133
Essai 3	131	154	139	120
	131	144	156	136
Essai 4	159	139	128	120
	182	142	140	118
Moyenne	<b>159</b>	<b>151,3</b>	<b>129,8</b>	<b>127</b>

Les temps nécessaires à induire l'immobilité se révèlent significativement différents pour des débits de CO<sub>2</sub> de 1L/min versus 2,75L/min, 1L/min versus 2,25L/min et 1,5L/min versus 2,75L/min. Les temps nécessaires à induire l'arrêt respiratoire se révèlent significativement différents pour des débits de CO<sub>2</sub> de 1L/min versus 2,75L/min, 1L/min versus 2,25L/min 1,5L/min versus 2,25L/min et 1,5L/min versus 2,75L/min (cf. tableaux 25 et 26 et figures 20 et 21).

**Figure 20 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'immobilité chez la souris NMRI euthanasiée par groupe de deux en fonction des différents débits de CO<sub>2</sub> d'après les données du tableau 25 (Expérience 3, N=8)**



**Figure 21 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'arrêt respiratoire chez la souris NMRI euthanasiée par groupe de deux en fonction des différents débits de CO<sub>2</sub> d'après les données du tableau 26 (Expérience 3, N=8)**

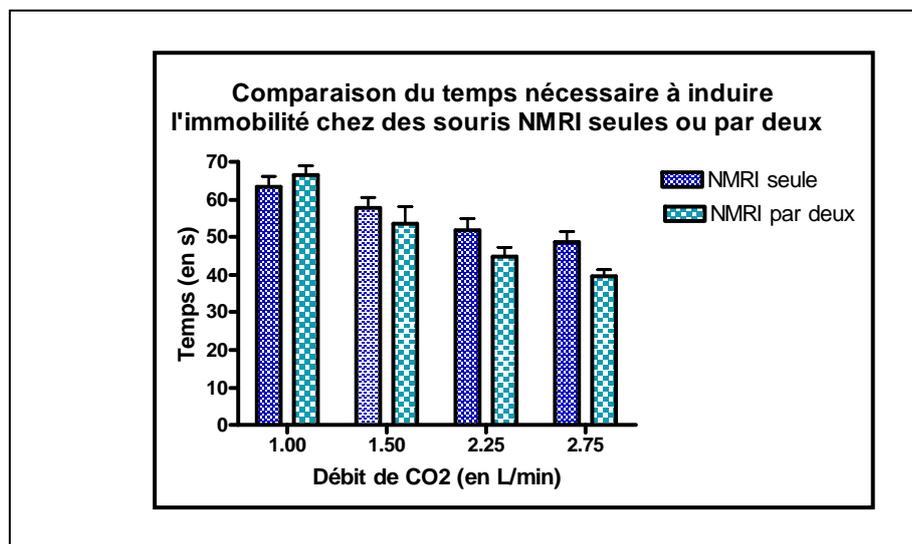


Aucune souris NMRI n'a effectué de saut au cours de leur euthanasie par groupe de deux, quelque soit le débit utilisé.

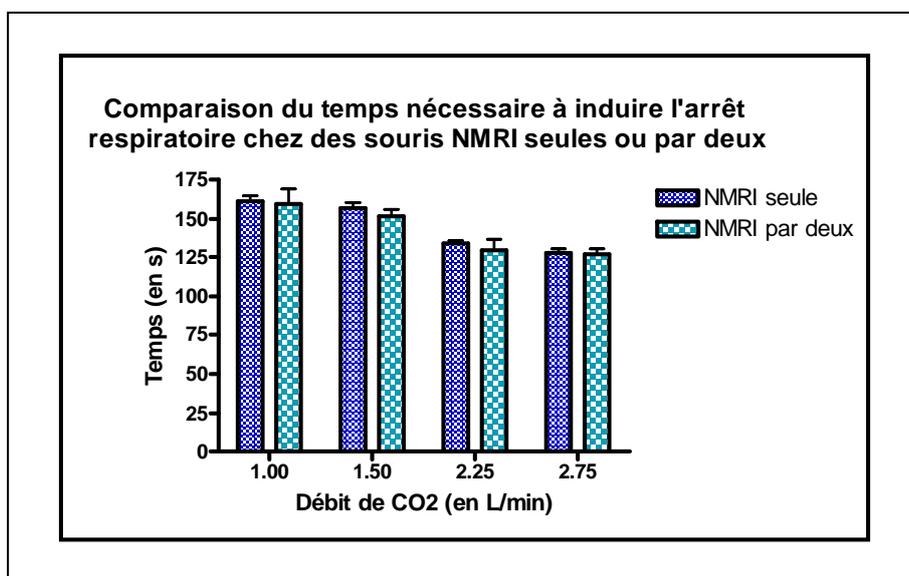
#### II.4.5. Expérience n°3 versus expérience n°1

Aucune différence significative n'est observée entre le temps nécessaire à induire l'immobilité et le temps nécessaire à induire l'arrêt respiratoire chez les souris NMRI euthanasiées seules ou par deux (cf. figures 18 et 19).

**Figure 22 : Comparaison du temps (en secondes) nécessaire à induire l'immobilité chez des souris NMRI seules ou par deux d'après les données des tableaux 18 et 25**



**Figure 23 : Comparaison du temps (en secondes) nécessaire à induire l'arrêt respiratoire chez des souris NMRI seules ou par deux d'après les données des tableaux 19 et 26**



Concernant les signes de détresse chez les souris NMRI euthanasiées par groupe de deux aucun saut n'a été observé, ce qui est significativement différent de l'euthanasie des souris euthanasiées seules pour les débit de 1L/min, 1,5L/min, 2,25L/min (cf. tableau 20).

## II.4.6. Observations supplémentaires

Lors des différents essais sur les trois expériences, il a été observé que certaines souris présentaient des écoulements mousseux au niveau du nez parfois accompagnés d'un peu de sang en fin d'expérience. On observe que le nombre de ces écoulements est plus important pour le débit le plus faible et le débit le plus élevé.

**Tableau 27 : Souris ayant présenté des écoulements au niveau du nez en fonction des différentes concentrations de CO<sub>2</sub>**

		1L /min	1,5L /min	2,25L/min	2,75L/min
NMRI seules	E1	/	Écoulement	/	/
	E2		Écoulement		/
	E3		/		Écoulement
	E4		/		Écoulement
	E5		/		/
	E6		/		Écoulement +sang
	E7		/		/
	E8		/		/
	E9		/		/
	E10		/		/
	E11		/		/
	E12		/		/
	E13		/		/
	E14		Écoulement		/
	E15		/		/
	E16		/		/
	E17		/		/
C 57 seules	E1 à E6	/	/	/	/
NMRI par 2	E1	Écoulement	/	/	Écoulement+sang
	E2	Écoulement+sang		/	
	E3	Écoulement		Écoulement	/
	E4	/		/	/

D'une façon générale, les souris euthanasiées par deux étaient plus agitées que celles euthanasiées seules. Les souris C57 étaient les plus calmes, elles présentaient la particularité de faire plus d'apnées que les autres souris.

Toutes les souris présentaient rapidement une hyperventilation marquée et une ataxie, leur survenue était d'autant plus rapide que le débit de CO<sub>2</sub> était élevé. Toutes les souris présentaient tardivement, après la perte de conscience (estimée par immobilité + 30s), des hoquets peu esthétiques.

Enfin, des signes d'aversion ont été observés pour tous les débits : lorsqu'une souris s'approchait du tuyau d'arrivée du CO<sub>2</sub>, elle avait un mouvement de recul. Il est arrivé que certaines souris mettent leur tête dans le tuyau d'arrivée du CO<sub>2</sub> pour les débits les plus faibles mais elles la ressortaient très rapidement.

Observations des témoins (souris n'ayant pas été exposées au CO<sub>2</sub>) :

Les souris témoins présentaient un comportement exploratoire, elles montaient fréquemment le long des parois, cherchaient à mettre leur tête dans le tuyau d'arrivée du CO<sub>2</sub> (en bas) et dans le tuyau d'évacuation (en haut).

## II.5. Interprétation

A la vue des résultats précédents, il semble que les souris exposées à un débit de CO<sub>2</sub> élevé, 2,75L/minutes, présentent moins de signe de détresse que les autres souris. De plus, à ce débit, les temps nécessaires à induire l'immobilité et l'arrêt respiratoire sont les plus courts. Il semblerait donc plus indiqué d'utiliser un débit de CO<sub>2</sub> élevé lors de l'euthanasie de souris.

La souche ne semble pas influencer ici les temps nécessaires à induire l'immobilité et l'arrêt respiratoire, ceux-ci ne variant pas significativement entre les souris NMRI et C57. Il serait tout de même intéressant de recommencer une telle expérience avec un nombre de souris C57 plus important et de même poids que les NMRI pour mettre en évidence une éventuelle différence du temps nécessaire à induire l'immobilité.

D'une façon générale, les souris C57 étaient moins agitées que les souris NMRI quel que soit le débit de CO<sub>2</sub> utilisé. Les souris C57 n'ont d'ailleurs effectué aucun saut avant leur immobilité.

Les résultats de cette expérience sont en accord avec ceux trouvés pour les souris NMRI. L'utilisation d'un débit de gaz élevé induisant une perte de conscience et une mort rapide semble à privilégier.

Les souris n'étant jamais euthanasiées seules par le CO<sub>2</sub>, l'influence du nombre devait être prise en compte. Lors de cette étude, il n'a pas été observé de différences significatives entre le temps nécessaire à induire l'immobilité et celui nécessaire à induire la mort chez des souris NMRI seules ou par groupe de deux. Par contre, il paraît important de noter une plus grande agitation des souris en groupe que ce soit pendant l'euthanasie ou lorsqu'elles étaient dans l'enceinte en l'absence de gaz (sauts).

Les écoulements accompagnés de sang sont difficiles à interpréter : en effet ils n'étaient présents qu'à la fin de l'essai et on peut donc se demander si ce liquide est lié à l'euthanasie au CO<sub>2</sub> proprement dite ou au vide pendant la phase d'extraction. De plus rien ne prouve que les causes de cet écoulement soient à l'origine d'une douleur chez l'animal.

Le nombre important de mictions quel que soit le débit de CO<sub>2</sub>, juste avant la mort pourrait être expliqué par un relâchement des sphincters.

Le nombre plus important de défécations chez les souris témoins est difficilement interprétable (stress lié au changement d'environnement chez des animaux restant beaucoup plus longtemps conscients dans l'enceinte).

Le CO<sub>2</sub> ne paraît pas causer une souffrance extrême chez les souris mais des signes d'aversion ont tout de même été relevés, mouvement de recul devant le tuyau d'arrivée du CO<sub>2</sub>. De plus il est difficile de savoir si l'hyperventilation et l'ataxie observées ne causent pas une certaine souffrance chez l'animal. Les temps nécessaires à induire la perte de conscience et la mort, même pour des débits élevés, restent longs.

## II.6. Conclusion

D'après les résultats de cette étude, il semblerait plus éthique d'utiliser un débit de CO<sub>2</sub> élevé autour de 65-80% par minute : de tels débits entraînent une perte de conscience et une mort relativement rapides avec peu de signes de souffrance.

Il serait instructif de compléter cette étude en mesurant des paramètres physiologiques : pression artérielle avec détection de l'apparition de la bradycardie (signe d'une activation des nocicepteurs), EEG pour déterminer la perte de conscience comme réalisé chez le rat pour le meeting de Newcastle (29).

Il serait également intéressant de pouvoir augmenter le nombre d'animaux par enceinte car cette technique est réalisée en pratique sur un nombre d'animaux important.

Cette étude ne permet pas d'évaluer certains paramètres environnementaux comme l'influence de la réalisation de l'euthanasie dans la cage d'hébergement de l'animal, l'influence de la litière. Elle présente de plus le problème d'être difficilement transposable à un appareil spécifique de l'euthanasie d'un grand nombre d'animaux au CO<sub>2</sub>. De plus, dans les appareils dédiés à l'euthanasie, l'arrivée du CO<sub>2</sub> se fait par le haut et même si le débit en pourcentage par minute est le même que dans cette étude, le débit en litre par minute est beaucoup plus élevé et l'on peut se demander si le flux d'air et le bruit qui en découle, ne peuvent créer un stress supplémentaire chez la souris.

## **II.7. Etude préliminaire rat**

### **II.7.1. Objectif**

L'objectif de cette étude était d'avoir une première idée sur l'existence d'éventuelles différences comportementales entre le rat et la souris et de connaître approximativement le temps nécessaire à induire l'immobilité et l'arrêt respiratoire chez le rat.

### **II.7.2. Matériel et méthode**

#### **II.7.2.1. Matériel**

Le matériel utilisé dans cette étude est le même que celui utilisé pour l'étude souris.

#### **II.7.2.2. Animaux**

Rat : mâles

Souche : Wistar (Fournisseur : CR)

Poids moyen au moment de l'étude :

-106g pour les petits rats

-286g pour les rats moyens

-315g pour les gros rats

Alimentation : A03 de chez Safe ou aliment RZ de chez Ssniff

Effectif → 20 rats

Au total 20 rats ont été utilisés dans cette expérience réalisée en un jour, répartis en 5 groupes de 4 rats.

Les petits et les gros rats proviennent du même protocole de neurologie. Ce protocole consiste en l'étude des effets d'un produit sur le comportement de reconnaissance d'un rat adulte vis à vis d'un jeune rat. Les 2 animaux sont mis en présence une première fois et leur comportement de reconnaissance est observé (T1) ; 2 heures plus tard, le test et l'observation sont réitérés (T2). Les composés facilitateurs mnésiques entraînent une diminution de la durée de ce comportement de reconnaissance.

Les rats de taille moyenne proviennent d'un protocole de reconnaissance d'objet. Ce protocole repose sur la propension naturelle du rongeur à explorer les éléments présents dans son environnement, dans le présent test, deux objets placés dans un open-field. Après un délai déterminé, le rat, replacé dans le même environnement, est capable de discriminer l'objet qu'il connaît déjà d'un nouvel objet. L'activité pharmacologique promnésique d'un composé d'intérêt se traduit par une exploration en faveur de l'objet nouveau au détriment de l'exploration de l'objet (re)connu.

#### **II.7.2.3. Méthode**

La méthode est identique à celle utilisée chez la souris.

#### **II.7.2.4. Statistiques**

Le faible nombre d'animaux ne permet pas la réalisation d'analyses statistiques.

### II.7.3. Résultats

Les données brutes figurent ci-dessous (cf. tableaux 28 et 29).

**Tableau 28 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'immobilité chez le rat Wistar en fonction du débit de CO<sub>2</sub> (N=4)**

Rats		1L/min	1,5 L/min	2,25L/min	2,75 L/min
Petits	Essai 1	56	53	55	73
	Essai 2	103	68	78	73
Moyens	Essai 3	95	67	66	55
Gros	Essai 4	56	56	69	51

Le temps nécessaire à induire l'immobilité varie beaucoup même pour des rats pesant le même poids et euthanasiés avec le même débit de CO<sub>2</sub> (103 secondes versus 56 secondes pour un débit de 1L/min).

Le temps nécessaire à induire l'immobilité est compris entre 51 secondes pour un débit de 2,75 L/min pour les gros rats et 103 secondes pour un débit de 1L/min pour les petits rats.

**Tableau 29 : Temps (en secondes) nécessaire à induire l'arrêt respiratoire chez le rat Wistar en fonction du débit de CO<sub>2</sub> (N=4)**

Rats		1L/min	1,5 L/min	2,25L/min	2,75 L/min
Petits	Essai 1	252	176	179	202
	Essai 2	215	244	185	143
Moyens	Essai 3	223	241	158	214
Gros	Essai 4	195	268	205	194

Le temps nécessaire à induire l'arrêt respiratoire varie beaucoup même pour des rats pesant le même poids et euthanasiés avec le même débit de CO<sub>2</sub> (176 versus 244 secondes pour un débit de 1,5L/min)

Le temps nécessaire à induire l'arrêt respiratoire est compris entre 143 secondes pour un débit de 2,75L/min et 252 secondes pour un débit de 1L/min chez les petits rats.

Observations supplémentaires :

Les rats étaient plutôt calmes. Pour le débit le plus élevé, certains rats ont présenté de grandes difficultés respiratoires (tête vers le haut et l'arrière) avant la perte de conscience.

### II.7.4. Interprétation et conclusion

Compte tenu du faible nombre de données, on ne peut pas mettre en évidence des différences significatives entre les débits et entre les différentes tranches de poids. Il semblerait tout de même que les signes d'aversion seraient plus nombreux pour des concentrations élevées.

On peut toutefois noter que les temps nécessaires à induire l'immobilité et l'arrêt respiratoire sont très longs.

## CONCLUSION

L'utilisation des animaux de laboratoire dans le cadre de la recherche notamment pharmacologique reste une nécessité conduisant le plus souvent en fin d'expérience à une euthanasie. Il convient par conséquent de choisir la technique la mieux adaptée parmi le large panel des techniques pouvant être pratiquées en tenant compte des critères suivants : espèce, nombre d'animaux, motif de l'euthanasie, état de l'animal au moment de l'euthanasie (vigile ou non), mis aussi des compétences du personnel. En France ces techniques ne sont pas réglementées, il est seulement dit qu'on doit utiliser des méthodes « humaines ». Les critères d'acceptabilité communs à toutes les techniques ainsi que les différentes techniques préconisées sont détaillées dans les recommandations de la commission européenne de la DGXI de 1996 et 1997 (23, 24).

Parmi toutes ces techniques, certaines restent soumises à controverse notamment l'euthanasie par décapitation et celle par dislocation cervicale sur animaux vigiles. D'après les résultats des études menées sur ces techniques (1, 10, 14, 19, 22, 26, 32, 38, 41, 45, 47, 56, 57), il semblerait qu'elles n'induisent pas de douleur chez l'animal en cas de réalisation par un opérateur expérimenté. Mais compte tenu de leur difficulté tant technique que psychologique de réalisation pour l'opérateur une sédation préalable ou l'utilisation d'une autre technique devrait être envisagée.

Ces techniques sont d'ailleurs soumises à autorisation aux Etats-Unis. Des preuves (documents, raisonnements scientifiques...) qu'aucune autre technique ne peut être utilisée doivent être apportées ce qui est relativement difficile au regard de la bibliographie concernant les effets biologiques des différentes techniques d'euthanasie.

L'euthanasie au CO<sub>2</sub>, une des techniques les plus utilisées, est très controversée actuellement. Aux vues des nombreux articles parus à ce sujet, elle paraît présenter un certain nombre de problèmes éthiques : irritations des muqueuses (29), activation des nocicepteurs chez le rat anesthésié (54), induction de réaction comportementale de détresse (16, 17, 20, 35, 44, 53), aversion marquée par rapport à d'autres gaz (40, 43, 44), lésions histologiques (17, 20, 25), temps nécessaire à la perte de conscience long (16, 17, 20, 28, 29, 30, 33, 35, 42, 53). De plus des expériences réalisées chez l'homme ont montré que l'inhalation de CO<sub>2</sub> se révélait douloureuse dès une concentration de 50% (6, 20). La mise en évidence de ces problèmes a abouti à la recherche d'améliorations (16, 17, 28, 29, 30, 35, 53) et de techniques de remplacement (15, 17, 33, 42, 43, 44) mais pour le moment les différentes tentatives restent peu concluantes. Il semble qu'à la vue des derniers résultats l'utilisation d'une chambre à remplissage progressif serait préférable à celle d'une chambre pré remplie. L'utilisation de l'argon (42, 43) tout comme la réalisation d'une anesthésie gazeuse (44, 48) préalable à une euthanasie au CO<sub>2</sub> restent des possibilités à explorer.

Dans la pratique, la technique d'euthanasie au CO<sub>2</sub> restant très utilisée notamment dans l'industrie pharmaceutique, j'ai étudié de nouveaux appareils et réalisé des expériences visant à optimiser la pratique de cette technique au sein d'un centre de recherche pharmacologique. D'après les résultats de l'étude réalisée, il semblerait plus éthique d'utiliser un débit de CO<sub>2</sub> élevé autour de 65-80% par minute : de tels débits entraînent une perte de conscience et une mort relativement rapides avec peu de signes de souffrance chez la souris. Le nombre de souris par cage ainsi que la souche des souris n'ont pas eu d'impact que ce soit sur le temps nécessaire à induire l'immobilité ou l'arrêt respiratoire.

Cependant, de nombreuses études restent à réaliser afin d'améliorer au maximum cette technique. En effet des paramètres environnementaux comme l'influence de la cage d'hébergement de l'animal, de la litière, d'un débit élevé engendrant un flux d'air important et du bruit lors de l'euthanasie, celle de l'euthanasie simultanée d'un grand nombre d'animaux... devront être évalués.



## BIBLIOGRAPHIE

1. ALLRED JB, BERNTSON GG. Is euthanasia of rats by decapitation inhumane? *J Nutr.* ,1986, **116**, 1859-1861.
2. AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med.*, 1978, **173**(1), 59-72.
3. AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med.*, 1986, **188**(3), 253-268.
4. AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med.*, 1993, **202**(2), 229-249.
5. AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION Guidelines on Euthanasia (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia), 2007, 1-36.
6. ANTON F, EUCHNER I, HANDWERKER HO. Psychological examination of pain induced by defined CO<sub>2</sub> pulses applied to the nasal mucosal. *Pain*, 1992, **49**, 53-60.
7. ANZCCART. Euthanasia of Animals Used for Scientific Purposes, 2<sup>nd</sup> ed. ,2001, 36p.
8. ARTWOHL J, BROWM P, CORNING B, STEIN S. Report of the ACLAM Task Force on rodent Euthanasia. *J Am Assoc Lab Anim*, 2006, **45**(1):98-105.
9. BERGER-SWEENEY J, BERGER UV, SHARMA M, PAUL CA. Effects of carbon dioxide-induced anesthesia on cholinergic parameters in rat brain. *Lab An Sci.*, 1994, **44**, 369-371.
10. BOSLAND MC. Is Decapitation a Humane Method of Euthanasia in Rodents? A Critical Review. *Contemp Top Lab Anim Sci.*, 1995, **34**(2), 46-48.
11. BUTLER MM, GRIFFEY SM, CLUBB FJ JR, GERRITY LW, CAMPBELL WB. The effects of euthanasia technique on vascular arachidonic acid metabolism and vascular and intestinal smooth muscle contractility. *Lab Anim Sci.* 1990,**40**(3), 277-283.
12. CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. Guide to the Care of Experimental Animals., Vol. 1, 2<sup>ème</sup> Ed, 1993.
13. CARNEY JA, WALKER BL. Mode of killing and plasma corticosterone concentrations in the rat. *Lab Anim Sci.*, 1973, **23**(3), 675-676.
14. CARTNER SC, BARLOW SC, NESS TJ. Loss of Cortical Function in Mice After Decapitation, Cervical Dislocation, Potassium Chloride Injection, and CO<sub>2</sub> Inhalation. *Comp Med.*, 2007, **57**(6), 570-573.
15. CLIFFORD DH, CRUSE E, BOATFIELD MP. Euthanasia by CO<sub>2</sub> and halothane alone and in combination in rats. *Lab Anim Sci.*, 1985, **35**(5), 540.
16. COENEN AM, DRINKENBURG WH, HOENDERKEN R, VAN LUIJELAAR EL. Carbon dioxide euthanasia in rats: oxygen supplementation minimizes signs of agitation and asphyxia. *Lab Anim.*, 1995, **29**(3), 262-268.
17. CONLEE KM, STEPHENS ML, ROWAN AN, KING LA. Carbon dioxide for euthanasia: concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats. *Lab Anim.*, 2005, **39**, 137-161.
18. Conseil des Communautés Européennes. Directive 86/609/CEE concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des Etats membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, 24 novembre 1986.
19. CURTIS SK. Euthanasia by cervical dislocation: when is it justified? Where's the justification?, *Lab Anim.*, 2004, **33**(8), 15-16.
20. DANNEMAN PJ, STEIN S, WALSHAW SO. Humane and practical implications of using carbon dioxide mixed with oxygen for anaesthesia or euthanasia of rats. *Lab Anim Sci.*, 1997, **47**(4), 376-385.

21. Décret n°87-848 de 19 octobre 1987 pris pour application de l'article 454 du Code Pénal et du troisième alinéa de l'article 276 du Code Rural et relatif aux expériences pratiquées sur les animaux, JO du 20.10.1987, modifié par le décret n°2001-464 du 29.05.2001, JO du 31.05.01.
22. DERR RF. Pain perception in decapitated rat brain., *Life Sci.*, 1991,**49**(19), 1399-1402.
23. EUROPEAN COMMISSION. Working Party Report: Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. *Lab Anim.*, 1996, **30**, 293-316.
24. EUROPEAN COMMISSION. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXI of the European Commission. *Lab Anim.*, 1997, **31**, 1-32.
25. FELDMAN DB, GUPTA BN. Histopathologic changes in laboratory animals resulting from various methods of euthanasia. *Lab Anim Sci.*, 1976, **26**(2), 218-221.
26. FITZPATRICK A. Euthanasia by cervical dislocation: when is it justified? Submit the references, *Lab Anim.*, 2004, **33**(8), 16.
27. GOLLEDGE H, ROUGHAN J, NIEL L, RICHARDSON C, WRIGHT-WILLIAMS S, FLECKNELL P, Power Point : *Carbon dioxide euthanasia of rats-behavioural and autonomic responses to exposure*, University of Newcastle upon Tyne, UK, 2006.
28. HACKBARTH H, KÜPPERS N, BOHNET W. Euthanasia of rats with carbon dioxide-animal welfare aspects. *Lab. Anim.* ,2000, **34**, 91-96.
29. HAWKINS P, PLAYLE L, GOLLEDGE H, LEACH M, BANZETT R, COENEN A AND AL. Euthanasia of Laboratory Animals. In: *Newcastle Consensus Meeting on Carbon Dioxide*. University of Newcastle upon Tyne, UK, 27-28 February 2006, 1-17.
30. HEWETT TA, KOVACS MS, ARTWOHL JE, BENNETT. A comparison of euthanasia methods in rats, using carbon dioxide in prefilled and fixed flow rate filled chambers. *Lab An Sci.*, 1993, **43**, 579-582.
31. Home Office. Code of Practice for the Humane Killing of Animals under Schedule 1 to the Animals (Scientific procedures) Act 1986, revised en 1997, 11p.
32. HOLSON RR. Euthanasia by Decapitation: Evidence That This Technique Produces Prompt, Painless Unconsciousness in Laboratory Rodents. *Neurotoxicol Teratol.*, 1992, **14**(4), 253-257.
33. HORNETT TD, HAYNES AR, Comparison of carbon dioxide/air mixture and nitrogen/ air mixture for the euthanasia of rodents. Design of a system for inhalation euthanasia. *Animal technology*, 1984, **35**,93-9.
34. IACUC. Euthanasia Guidelines and Policies. [en ligne], [[http://research.unc.edu/iacuc/sop/euthanasia\\_general.php](http://research.unc.edu/iacuc/sop/euthanasia_general.php)] (consultée le 08/04/08)
35. IWARSSON K, REHBINDER C. A study of different euthanasia techniques in guinea pigs, rats and mice. Animal response and post-mortem findings. *Scand J Lab Anim Sci.*, 1993, **20**(4), 191-205.
36. JOHNSON D, BLASZAK K: Bureau of Animal Welfare, DPI Victoria. Carbon Dioxide for Euthanasia of Laboratory Animals., 2005, 7p.
37. JONES DM, ARTER J, BERGER-SWEENEY. Carbon dioxide-induced anaesthesia has no effects on brain biogenic amine concentration in mice. *Lab An Sci.*, 1999, **49**, 316-318.
38. KANDZIOLKA L. Euthanasia by cervical dislocation: when is it justified? Avoid a double standard. *Lab Anim.*, 2004, **33**(8), 16.
39. KASTEN T, COLLIVER JA, MONTREY RD, DUNAWAY GA. The effects of various anesthetics on tissue levels of fructose-2,6-bisphosphate in rats. *Lab An Sci.*, **40**, 399-401.

40. KIRKDEN RD, NIEL L, WEARY DM. Aversion to carbon dioxide. *Lab Anim.*, 2005, **39**, 452-455.
41. KLEMM WR. Correspondance. *Lab Anim Sci.*, 1987, **37**(2), 148-151.
42. LAWSON D, SHARP J, AZAR T. Comparison of Carbon Dioxide, Argon and Nitrogen for Inducing Unconsciousness or Euthanasia of Rats. *J Am Ass Lab Anim Sci.*, 2006, **45**(2), 21-25.
43. LEACH MC, BOWELL VA, ALLAN TF, MORTON DB. Aversion to Gaseous Euthanasia Agents in Rats and Mice, *Comp Med.*, 2002, **52**(3), 249-257.
44. LEACH MC, BOWELL VA, ALLAN TF, MORTON DB. Measurement of aversion to determine humane methods of anaesthesia and euthanasia. *Animal welfare* , 2004, **13**, S77-86.
45. LORDEN JF. Correspondance. *Lab Anim Sci.*, 1987, **37**(2), 148.
46. MATHE AA, STENFORS C, BRODIN E, THEODORSSON E. Neuropeptides in brain: effects of microwave irradiation and decapitation. *Life Sciences*, 1990, **46**, 287-293.
47. MIKESKA JA, KLEMM WR. EEG evaluation of humaneness of asphyxia and decapitation euthanasia of the laboratory rat. *Lab Anim Sci.*, 1975, **25**(2), 175-179.
48. Questionnaire for experts and organisations on the preliminary findings of an impact assessment of options for the revision of the Directive for the protection of animals used in experiments (Public consultation on the revision of Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes). [en ligne]. [<http://ec.europa.eu/yourvoice/imp/forms/dispatch>], (consultée le 18/08/06)
49. SCHORSCH F. *Euthanasie. Autopsie*. Polycopié. Formation spéciale expérimentation animale ENVA, septembre 2007, 1-29.
50. SCHRIEFER JA, PLUNKETT WC, HASSEN AH. Decapitation increases plasma sodium and potassium in the rat. *J Pharmacol Methods*, 1989, **21**, 155-159.
51. SERVIERE J. *Nociception, Douleur et Stress. Les données de neurosciences et le contrôle de la douleur en situation expérimentale*. Polycopié. Formation spéciale expérimentation animale ENVA, septembre 2007, 27p.
52. SIEGEL, SIDNEY and CASTELLAN, Jr N. JOHN. Nonparametric Statistics for Behavioral Sciences. 2<sup>nd</sup> ed. McGraw-Hill Book compagny, 1988, 191-200.
53. SMITH W, HARRAP SB. Behavioural and cardiovascular responses of rats to euthanasia using carbon dioxide gas, *Lab Anim.*, 1997, **31**, 337-346.
54. THÜRAUF N, FRIEDEL I, HUMMEL C, KOBAL G. The mucosal potential elicited by noxious chemical stimuli with CO<sub>2</sub> in rats: is it a peripheral nociceptive event? *Neurosci Lett.*, 1991, **128**, 297-300.
55. University For Animal Welfare (UFAW), Report on euthanasia of unwanted, injured or diseased animals for education or scientific purposes. Herts, U.K.: UFAW, 1986.
56. VANDERWOLF CH, BUZSAKI G, CAIN DP, COOLEY RK, ROBERTSON B. Neocortical and hippocampal electrical activity following decapitation in the rat. *Brain Res.*, 1988, **451**, 340-344.
57. WARREN AL. Decapitation of laboratory animals and euthanasia. *J Am Vet Med Assoc.*, 1979, **174**, 3.
58. WINER BJ. Statistical principles in experiment design. 2<sup>nd</sup> ed. McGraw-Hill Book compagny, 1971, 26-44, 445-449.
59. WOOD RW. Aversiveness of carbon dioxide. *Lab Anim.*, 2005, **39**, 353-35.
60. ZARCHIN N, MAYEVSKY A. The effects of age on the metabolic and electrical responses to decapitation in the awake and the anesthetized rat brain. *Mech Ageing Develop.*, 1981, **16**, 285-294.





# LISTE DES ABRÉVIATIONS

**ACTH** : Adreno CorticoTropic Hormone  
**ANZCCARCT** :Australia and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching  
**AVMA** : American Veterinary Medical Association  
**CCAC** : Canadian Council on Animal Care  
**CPA** : Comité de Protection des Animaux  
**EEG** : Electroencéphalogramme  
**FSH** : Hormone Folliculo-Stimulante  
**GABA** : Acide Gamma-AminoButyrique  
**IACUC** : Institutional Animal Care and Use Committee  
**IASP** : International Association for the Study of Pain, Association Internationale pour l'Etude de la Douleur  
**IC** : Intra-cardiaque  
**IdRS** : Institut de Recherche Servier  
**IP** : Intra-péritonéale  
**IV** : Intraveineuse  
**JAVMA** : Journal of the American Veterinary Medical Association  
**LH** : Hormone Luteinisante  
**LTc** : Lymphocyte T cytotoxique  
**LVFA** : Low Voltage, Fast Activity  
**MAP**: Mean Arterial blood Pressure  
**NPY** : Neuropeptide Y  
**NIH** : National Institutes of Health  
**REM** : Rapid Eye Movement  
**SNC** : Système Nerveux Central  
**SP** : Substance P  
**UFAW** : Universities Fedaration for Animal Welfare  
**VAS** : Visual Analog Scale  
**VIP** : Vasoactive Intestinal Polypeptide



# **TECHNIQUES CONTROVERSEES D'EUTHANASIE DES ANIMAUX DE LABORATOIRE : APPLICATION EXPERIMENTALE A L'EUTHANASIE AU CO<sub>2</sub>**

**MOREAU Stéphanie**

## **Résumé**

Dans le cadre de la recherche pharmaceutique, malgré le développement de méthodes alternatives, le recours à l'animal de laboratoire reste une nécessité. Il convient néanmoins de s'interroger sur la manière de limiter ce recours et, le cas échéant, d'améliorer au maximum les conditions de réalisation des expérimentations.

C'est dans cette optique d'amélioration des expérimentations que le projet de ma thèse a été initié par le comité d'éthique d'un centre de recherche pharmacologique. La technique d'euthanasie des rongeurs au CO<sub>2</sub> étant très utilisée dans les centres de recherche pharmacologique bien que soumise à controverse, il semblait important de visualiser ce qu'il en était en observant le comportement des rongeurs durant la réalisation de cette technique. L'idée était d'évaluer le degré de souffrance ressenti par les animaux et s'il y avait possibilité le cas échéant de modifier certains paramètres pour limiter les risques de souffrance chez l'animal.

Dans une première partie bibliographique, l'euthanasie est replacée dans un cadre réglementaire, les techniques d'euthanasie des animaux de laboratoire sont présentées ainsi que les principales techniques soumises à controverse : la décapitation et la dislocation sur animal vigile et l'euthanasie au CO<sub>2</sub> qui sont étudiées en détail.

Dans une deuxième partie, la pratique de l'euthanasie au CO<sub>2</sub> dans un centre de recherche pharmacologique est détaillée puis la partie expérimentale est développée. Il a été décidé sur la base des recherches bibliographiques, d'étudier dans un premier temps l'effet de différents débits de CO<sub>2</sub> pour induire l'euthanasie, puis l'influence de la souche de (NMRI et C57Bl6) et du nombre de souris. Enfin, afin de mettre en évidence d'éventuelles différences comportementales entre le rat et la souris, une étude préliminaire a été réalisée chez le rat.

**Mots clés : EXPERIMENTATION  
ANIMALE/EUTHANASIE/TECHNIQUE/CO2/ETHIQUE/SOUFFRANCE  
ANIMALE/ANIMAUX DE LABORATOIRE/RONGUEUR/RAT/SOURIS**

## **Jury :**

Président : Pr.

Directeur : Pr. Perrot Sébastien

Assesseur : Pr. Combrisson Hélène

Invitée : M<sup>me</sup>. Peyclit-Fourure Isabelle

Adresse de l'auteur :

Melle Moreau Stéphanie, 6 avenue Carnot, 91600 Savigny-sur-Orge

# **CONTROVERSIAL TECHNIC OF LABORATORY ANIMAL'S EUTHANASIA : EXPERIMENTAL APPLICATION TO EUTHANASIA WITH CO<sub>2</sub>**

**MOREAU Stéphanie**

## **Summary**

In the context of pharmaceutical research, in spite of the development of alternative methods, the recourse to the laboratory animals remains a need. It is advisable nevertheless to wonder about the manner of limiting this recourse and, if necessary, of improving to the maximum the conditions of realization of the experiments.

It is accordingly of experiments improvement that the project of my thesis was initiated by the ethics committee of a pharmacological research centre. The methods of rodent euthanasia with CO<sub>2</sub> being very much used in the pharmacological research centres although subjected to controversy, it seemed important to visualize what it was by observing the behavior of the rodents during this technique. The idea was to evaluate the degree of suffering felt by the animals and if there were possibility if necessary to modify parameters in order to limit the risks of suffering in the animal.

In a first bibliographical part, the euthanasia is replaced in a regulation framework, the techniques of euthanasia of the laboratory animals are presented as well as the principal methods subjected to controversy: the decapitation and the dislocation on conscious animal and the euthanasia with CO<sub>2</sub> which are studied in detail.

In a second part, the practice of the euthanasia with CO<sub>2</sub> in a pharmacological research center is detailed then the experimental part is developed. It was decided on the basis of bibliographical search, to initially study the effect of various CO<sub>2</sub> flows to induce the euthanasia, then the influence of the strain of (NMRI and C57Bl6) and the number of mice. Lastly, in order to highlight possible behavioral differences between the rat and the mouse, a preliminary study was carried out in the rat.

**Keywords: ANIMAL  
EXPERIMENTATION/EUTHANASIA/TECHNICS/CO<sub>2</sub>/ETHIC/ANIMAL  
SUFFERING/LABORATORY ANIMAL/ RODENT/RAT/MICE**

## **Jury :**

President : Pr.

Director : Pr. Perrot Sébastien

Assessor : Pr. Pr.Combrisson Hélène

Guest : M<sup>TS</sup>.Peyclit-Fourure Isabelle

Author's address:

Mrs Moreau Stéphanie, 6 avenue Carnot, 91600 Savigny-sur-Orge