



**MINISTÈRE
DE L'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR,
DE LA RECHERCHE
ET DE L'INNOVATION**

*Liberté
Égalité
Fraternité*



**MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
ET DE L'ALIMENTATION**

*Liberté
Égalité
Fraternité*

Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale

(Articles R214-134 à 136 du Code rural et de la pêche maritime)

Membres du Comité (Arrêté du 02 juillet 2019)

Pierre Mormede (Président), Nicolas Guy, Françoise Médale, Valérie Nivet-Antoine, Michel Tarpin, Patrick Gonin, Sophie Picavet, Véronique Mary, Sylvie Duclaux, Bijan Ghaleh, Francine Behar-Cohen, Nicolas Dudoignon, Jean-Claude Desfontis, Emmanuel Picavet, Dominique Bourg, Sonia Desmoulin-Canselier, Gérard Raphaël Larrère, Sarah Bonnet, Jean-Claude Nouët, Patricia Lortic, Georges Chapouthier, Amélie Romain, Léa Briard.

Recommandation sur la technique d'amputation de phalange comme méthode d'identification et de caractérisation génétique chez les rongeurs

Version 1 du 03/02/2021

Membres du groupe de travail

Nicolas Guy (animateur), Patrick Gonin, Patricia Lortic, Françoise Médale, Emmanuel Picavet, Amélie Romain, Virginie Vallet (MESRI), Sandryne Bruyas (MAA)

Recommandation sur la technique d'amputation de phalange comme méthode d'identification et de caractérisation génétique chez les rongeurs

Exposé des motifs :

L'ablation de phalange est une technique d'identification et de caractérisation génétique précoce utilisée chez le rongeur. Le caractère intrinsèquement mutilant de la technique suscite un questionnement éthique, et justifie de considérer son impact immédiat et à long terme sur le bien-être de l'animal. De plus, au regard des connaissances actuelles, il importe que la douleur des très jeunes animaux fasse l'objet d'une attention particulière.

La question posée est la suivante : cette méthode est-elle éthiquement acceptable au regard de l'objectif scientifique visé, et dans l'affirmative dans quelles conditions ?

Contexte :

L'utilisation de rongeurs à des fins scientifiques nécessite de pouvoir identifier les individus et de les caractériser d'un point de vue génétique le cas échéant.

L'identification permet de repérer un animal parmi ses congénères et de le suivre tout au long de sa vie expérimentale. En plus de cette identification, une caractérisation génétique moléculaire est nécessaire lorsque l'on utilise des lignées de rongeurs génétiquement modifiées afin de s'assurer de la présence ou de l'absence d'une mutation d'intérêt dans leur génome ou pour suivre une sélection sur marqueurs génétiques par exemple. L'identification des organismes génétiquement modifiés est par ailleurs requise par la réglementation sur les OGM. On parle de « génotypage », processus qui nécessite de prélever du tissu afin d'en réaliser l'analyse *in vitro*.

Les animaux peuvent être identifiés selon plusieurs techniques.

- Du point de vue strictement scientifique, le choix va dépendre de plusieurs paramètres liés aux nécessités du projet tels que le caractère permanent ou non du marquage, la fiabilité de la technique, l'âge d'identification, les conséquences à long terme incluant l'introduction possible de biais scientifiques, la nécessité d'une caractérisation génétique précoce couplée à l'identification (Bonaparte 2013).
- Sur le plan éthique, les méthodes utilisées étant contraignantes pour les animaux, il convient d'évaluer l'impact global de chacune de ces techniques sur le bien-être de l'animal, à savoir les effets immédiats (au moment de l'acte) et leurs conséquences ultérieures éventuelles en termes de douleur, de souffrance, d'angoisse ou de dommages durables, à mettre en balance avec les bénéfices scientifiques escomptés par la méthode choisie (cf. supra). Les limites éthiques seront alors appréciées en fonction du contexte scientifique et des conditions de mise en œuvre de la technique.

La technique d'identification par amputation de phalange consiste en l'ablation de la phalange la plus distale ayant pour conséquence, après cicatrisation, de présenter un doigt reconnaissable par l'absence de griffe à son extrémité. Les animaux peuvent ainsi être repérés en fonction de la localisation de l'amputation (combinaisons codées correspondant à un numéro) et le marquage est permanent. La phalange amputée pouvant servir à une analyse

généétique, cette technique permet d'effectuer à la fois une identification et une caractérisation génétique en une seule étape, limitant ainsi les manipulations sur l'animal.

Cette technique est particulièrement pertinente lorsqu'il est indispensable d'identifier de manière permanente et de génotyper de façon très précoce les animaux nouveau-nés lors de la première semaine postpartum.

État des lieux

La manipulation des rongeurs entraîne *de facto* du stress pour l'animal (Scheffer 2010), et la coupe d'une phalange est également mutilante et douloureuse. Il importe de considérer que la douleur chez les très jeunes animaux est importante contrairement à ce que l'on croyait auparavant, et reconnue dans la réglementation relative à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques. Les voies ascendantes de la douleur sont matures dès la fin de vie fœtale (Sternberg 2004) alors que les voies motrices descendantes qui permettent à l'animal d'exprimer une réponse à un stimulus douloureux sont encore immatures à la naissance. De plus en plus de preuves cliniques et précliniques suggèrent que les lésions tissulaires néonatales peuvent entraîner des modifications neurophysiologiques à long terme (Li 2019), notamment avec un risque de surexpression de la douleur lors d'interventions ultérieures même mineures.

En pratique, il faudra être attentif à ce que la technique soit toujours réalisée dans les règles de l'art. En raison de la petite taille des rongeurs nouveau-nés au moment de l'acte, les tentatives de couper uniquement la phalange distale ont pour résultat qu'une grande partie, voire la totalité du doigt est amputée (ce qui lui vaut l'appellation courante de coupure ou amputation des doigts en français et *toe-* ou *digit-clipping* en anglais). À l'inverse, une coupure trop distale omettant l'ablation de la matrice de la griffe, résultera en une repousse de celle-ci oblitérant le marquage de l'animal. Afin de pallier certaines dérives, un consensus international s'est dégagé en 2013 pour proposer un raffinement de la technique consistant en l'ablation de la phalange la plus distale et en limitant le nombre d'amputations à une seule phalange par patte (Bonaparte 2013).

L'impact immédiat et les conséquences ultérieures de cette technique en termes de douleur, de souffrances, d'angoisse ou de dommages durables affectant le bien-être de l'animal ont fait l'objet de plusieurs études (Schaefer 2010, Castelhana-Carlos 2010, Paluch 2014) menant à des conclusions sensiblement divergentes soulignées par une étude systématique de la littérature menée par SYRCLE* (Wever 2017). Cette étude conclut, sur la base de la littérature scientifique existante, qu'un impact à long terme sur le bien-être animal lié à l'ablation des phalanges ne peut être ni confirmé ni exclu.

*<https://www.syracle.network/>

Alternatives :

En l'état actuel des connaissances, les seules méthodes permettant un marquage permanent des animaux lors de la première semaine postpartum sont le tatouage des pattes (avec le même code que pour l'ablation) ou de la queue, ou l'ablation de phalange (Miao 2016). Cependant seule l'ablation de phalange permet de réaliser à la fois ce marquage permanent et la caractérisation génétique des animaux en une seule étape, limitant ainsi les manipulations sur les animaux.

La seule autre technique permettant de réaliser marquage permanent et biopsie en une seule étape est le poinçonnage des oreilles. Mais celui-ci n'est pas envisageable avant 14 jours après la naissance, en raison du développement insuffisant des oreilles avant cet âge (Bonaparte 2013).

Recommandation :

Considérant :

Que l'ablation d'une phalange chez le rongeur constitue indubitablement un acte invasif ;

Que l'état actuel des connaissances ne permet pas d'exclure que cette méthode induise un niveau significatif de douleur immédiate et des conséquences à long terme affectant le bien-être de l'animal et sa valeur scientifique ;

Que néanmoins certains objectifs scientifiques nécessitent de pouvoir identifier et génotyper très précocement les animaux pour l'acquisition des données scientifiques ;

Qu'au regard des techniques disponibles, l'amputation de phalange représente la seule méthode appropriée dans la situation où il est indispensable de réaliser simultanément l'identification et la caractérisation génétique des rongeurs à un stade précoce de leur développement postpartum ;

Que par ailleurs, l'amputation de phalanges à la seule fin d'identification sans nécessité de génotypage des animaux n'est pas acceptable car il existe d'autres techniques moins délétères ;

Le Comité émet l'avis suivant :

Le Comité considère que cette technique ne peut être admise qu'à titre dérogatoire lorsque toutes les conditions suivantes sont réunies :

1. Il est indispensable pour des raisons scientifiques d'atteinte de l'objectif du projet, de réaliser précocement et simultanément l'identification individuelle et le génotypage des rongeurs ;
2. La méthode est justifiée et décrite avec précision dans une demande d'autorisation de projet et fait ainsi l'objet d'une évaluation éthique ;
3. Le nombre d'amputations sera limité à une seule phalange par patte, ne concernera pas le pouce et autant que possible, privilégier les pattes postérieures pour ne pas compromettre la préhension fine que l'animal exerce avec ses pattes antérieures pour manger, se toiletter, interagir et grimper à la grille du couvercle de la cage.
4. L'identification sera réalisée entre les 7^{ème} et 10^{ème} jours postpartum, sauf cas très marginaux d'un acte plus précoce ne pouvant toutefois être réalisé avant 5,5 jours postpartum et justifié scientifiquement dans la demande d'autorisation de projet ;
5. Le geste sera réalisé par du personnel dûment formé ayant suivi un tutorat relatif à ce geste technique et qui utilisera le matériel approprié permettant la coupure précise et rapide de la seule phalange distale.

Cette recommandation fait l'objet d'une veille permanente et sera revue par le CNREEA notamment en fonction des avancées techniques et scientifiques, et au plus tard dans 5 ans. Le comité sera particulièrement attentif aux recherches portant sur la clinique de la douleur et au développement de méthodes efficaces et adaptées pour atténuer les impacts négatifs de la technique.

Références :

- Wever et al. A systematic review of discomfort due to toe or ear clipping in laboratory rodents. *Lab Anim.* 2017, Vol. 51(6) 583–600
- Schaefer et al. Analysis of physiological and behavioural parameters in mice after toe clipping as newborns *Lab Anim* 2010 44: 7-13
- Castelhano-Carlos et al. Identification methods in newborn C57BL/6 mice: a developmental and behavioural evaluation. *Lab Anim.* 2010 Apr;44(2):88-103
- Paluch et al. Developmental and behavioral effects of toe clipping on neonatal and preweaning mice with and without vapocoolant anesthesia. *Lab Anim Sci.* 2014 Mar;53(2):132-40.
- Bonaparte et al. FELASA guidelines for the refinement of methods for genotyping genetically-modified rodents: a report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group. *Lab Anim.* 2013 Jul;47(3):134-45.
- Li et al. Neonatal Injury Alters Sensory Input and Synaptic Plasticity in GABAergic Interneurons of the Adult Mouse Dorsal Horn. *J. Neurosci.* 2019 Oct. 39(40) :7815–7825.
- Miao et al. Tattooing Various Combinations of Ears, Tail, and Toes to Identify Mice Reliably and Permanently. *J. AALAS* 2016, 55(2) : 189-198
- Sternberg et al. Nociception and Antinociception During the First Week of Life in Mice: Sex Differences and Test Dependence. *The Journal of Pain.* 2004, 5(8) : 420-426.

Glossaire franco-anglais :

Amputation de la phalange distale : *toe-clipping / digit-clipping / distal phalanx-clipping*

Poinçonnage des oreilles : *ear-punch / ear-notching*

Note annexe en date du 20 avril 2022 à la

Recommandation sur la technique d'amputation de phalange comme méthode d'identification et de caractérisation génétique chez les rongeurs

La recommandation du CNREEA sur la phalangectomie considère que cette méthode ne peut être admise qu'à titre dérogatoire, et uniquement dans le cas où elle est incontournable. Le but est clairement d'en limiter au maximum l'utilisation.

Il convient de prendre en compte la phrase suivante des considérants :

« Qu'au regard des techniques disponibles, l'amputation de phalange représente la seule méthode appropriée dans la situation où il est indispensable de réaliser simultanément l'identification et la caractérisation génétique des rongeurs à un stade précoce de leur développement postpartum ; »

Cette phrase spécifie bien que cette méthode ne peut demeurer la seule appropriée que dans des cas bien particuliers où :

- L'identification et le génotypage simultanés sont indispensables ;
- Et ils sont à faire obligatoirement sur des animaux jeunes (« à un stade précoce »).

Ces cas ne concernent en pratique que peu d'élevages : il s'agit d'animaux pour lesquels il est indispensable d'obtenir à un âge précoce l'information du génotype, tout en les identifiant. C'est ainsi que le CNREEA n'a pas considéré que l'absence de possibilité d'utiliser des marquages pouvant aller jusqu'à des nombres importants soit incontournable.

L'esprit de la recommandation est donc de réserver cette méthode à des cas dérogatoires, rares, et pour lesquels les animaux concernés sont souvent par ailleurs concernés par une demande d'autorisation de projet, car c'est leur phénotype dommageable qui induit la nécessité de les génotyper précocement.

Conclusion :

Il n'est pas dans l'esprit de cette recommandation de prévoir la possibilité d'utiliser la phalangectomie comme méthode par défaut pour la biopsie (en vue de génotypage) et l'identification, et il n'est donc pas nécessaire de pouvoir utiliser des grands nombres. Cette méthode doit rester dérogatoire et attachée à des élevages spécifiques. Si la nécessité d'un génotypage précoce, avec identification, est liée à un phénotype dommageable (qu'il soit léger, modéré ou sévère), cet élevage, avec cette méthode, doivent être décrits et autorisés via le processus de demande d'autorisation de projet.