

OPTIMISATION DES TECHNIQUES D'EXPÉRIMENTATION ANIMALE

REFINEMENT OF ANIMAL EXPERIMENTATION TECHNIQUES

Par Patrick HARDY⁽¹⁾

(Communication présentée le 9 octobre 2008)

RÉSUMÉ

La mise en application de la règle des « 3 R » (Replace – Reduce – Refine) est une composante essentielle de l'expérimentation animale. Initialement présentée ou perçue comme une contribution aux valeurs éthiques et au respect de l'animal, elle apparaît également comme fortement synergique avec les objectifs scientifiques des études. Cet article vise à illustrer le R de « Refinement », c'est-à-dire l'optimisation des études, en étant focalisé sur ses aspects techniques.

Mots-clés : expérimentation animale, optimisation, 3 R, techniques.

SUMMARY

The implementation of the « 3 R » rule (Replace – Reduce – Refine) is a major component of the animal experimentation. Originally presented or perceived as a contribution to ethical values and animal welfare, it is also highly synergic with the studies' scientific objectives. This paper aims at illustrating the « R » of « Refinement » i.e. the optimisation of studies, focusing on its technical aspects.

Key words: animal experimentation, refinement, 3 R, ethics, techniques.

INTRODUCTION ET POSITION DU SUJET

Il y a près de cinquante ans, en 1959, Russel et Burch publiaient leur article « *The Principles of Humane Experimental Techniques* » qui énonçait pour la première fois les principes éthiques de base appliqués à l'expérimentation animale, à savoir la « règle des 3 R » (Russel & Burch, 1959) :

- remplacer (**Replace**) l'animal chaque fois que possible,
- réduire (**Reduce**) le nombre d'animaux au strict minimum pour répondre aux objectifs de l'étude,
- optimiser (**Refine**) les conditions dans lesquelles les animaux sont hébergés, soignés et utilisés.

Ces principes ont non seulement bénéficié d'un large écho dans la communauté scientifique et auprès des sociétés de protection animale mais ont également été intégrés dans les textes réglementant la protection de l'animal utilisé à des fins scientifiques, à savoir la directive européenne 86/609 (article 7) et le décret

français de 1987 modifié 2001 (article 10) qui en découle. Ces principes sont partie intégrante de tous les référentiels internationaux.

Cet article traite de l'aspect « optimisation » (*Refinement*) et comporte deux chapitres traitant d'une part, des soins et de l'hébergement et d'autre part, des techniques et pratiques expérimentales.

LA COMPOSANTE « SOINS ET HÉBERGEMENT »

La récente adoption de la révision de l'Annexe A de la Convention STE 123⁽²⁾ est sans doute la meilleure illustration de l'évolution du niveau d'exigence et des pratiques dans le domaine de l'expérimentation animale.

Outre les modifications relatives aux dimensions des enclos d'hébergement ou à la densité d'animaux autorisée, cette révision

(1) Directeur « Animal Science & Welfare », EMEA Clinical R&D, MERIAL

(2) L'Annexe A à la « Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques » a été remplacée, à compter du 15 juillet 2007, par l'Annexe A révisée telle qu'adoptée par la quatrième Consultation multilatérale des Parties à la Convention, le 15 juin 2006.

met l'accent sur « l'enrichissement du milieu » en réponse aux besoins comportementaux fondamentaux de chaque espèce et, pour les espèces concernées, la constitution et le maintien de groupes sociaux harmonieux.

Ces évolutions entraînent parfois des investissements considérables mais aussi et surtout une réflexion visant à identifier et à mettre en place les options d'hébergement et « d'enrichissement du milieu » ayant un impact objectif sur le bien-être animal et ce, pour chaque type d'étude utilisant l'animal.

Quand la démarche est menée avec le professionnalisme requis, les résultats sont optimisés à trois niveaux : le respect de l'animal et de son bien-être, la qualité des études, et la satisfaction des équipes scientifiques.

Un exemple simple et représentatif est celui des conditions d'hébergement des rongeurs utilisés dans les études réglementaires de sécurité du médicament, études le plus souvent menées dans le contexte des Bonnes Pratiques de Laboratoire. Après des essais préliminaires d'évaluation, de faisabilité et de recherche de fournitures répondant aux contraintes liées à ce type d'étude et à leur contexte, il a été possible par exemple de valider un système d'hébergement sur litière, avec un enrichissement constitué d'une part, de languettes de papier et d'autre part, d'un large tube en carton. Ce tube est utilisé comme refuge ou bien déchiqueté par les rongeurs comme substrat permettant, en complément des languettes de papier et de la litière, la composition d'un nid.

À côté d'un système d'hébergement enrichi, l'hébergement en groupe constitue un aspect fondamental du bien-être animal pour les espèces grégaires.

Dans le cas des études réglementaires de sécurité du médicament, outre un effet direct et facilement observable sur le répertoire comportemental, l'hébergement en groupe associé à cet enrichissement de base permet le maintien des animaux dans des conditions optimales lors d'études de long terme, en minimisant la surconsommation alimentaire, la prise de poids et les phénomènes pathologiques qui y sont classiquement associés.

L'enrichissement du milieu a également permis l'élaboration d'un score de « construction de nid » ou « *nest grading* », qui constitue un élément supplémentaire d'évaluation des effets indésirables des molécules testées, accompagnant, voire précédant, l'apparition de signes cliniques.

L'hébergement en groupe en « milieu enrichi » présente un bénéfice évident, avec différentes espèces et dans différents types d'études. Il est cependant essentiel de rappeler que l'approche utilisée doit être évaluée au cas par cas, afin de s'assurer du bénéfice pour l'animal et pour les études concernées, sans augmenter la variabilité des données ou en compliquant l'analyse.

LA COMPOSANTE « TECHNIQUE »

La composante « technique » ou de mise en œuvre des études présente de nombreuses facettes qui ne peuvent être toutes abordées ou même mentionnées dans une revue générale.

Ci-dessous sont décrits quelques exemples d'optimisation :

Les « points limites »

À titre d'exemple, citons l'application des « points limites » ou « *end points* » (publications de l'OCDE et du CCAC, Guide du GRICE). Le principe en est la détection la plus rapide possible de toute lésion, de tout signe clinique ou comportemental traduisant l'inconfort, le stress, la douleur ou une maladie. Ces signes peuvent être directement liés à l'étude (par exemple dans les essais de sécurité du médicament) ou non.

Selon le cas et selon des hypothèses de conduite définies préalablement à l'expérimentation, sont décidés l'arrêt ou la suspension de l'étude et de l'administration de la molécule étudiée, le retrait de l'animal de l'étude, la mise en œuvre d'un traitement analgésique, anti-infectieux ou d'autres soins médicaux ou chirurgicaux, voire l'euthanasie de l'animal.

Quel que soit le cas de figure, il est de la responsabilité du vétérinaire de sensibiliser et de former le personnel en charge de la surveillance des animaux, afin d'assurer une réaction rapide et efficace en cas d'observation clinique anormale.

La mise en application des points limites représente, avec les progrès en analgésie, anesthésie et soins péri-opératoires, un des aspects les plus importants de l'optimisation des études.

La modification génétique

Les progrès spectaculaires de la biologie cellulaire et moléculaire, associés à l'évolution des techniques de reproduction assistée, ont permis le développement des méthodes de modification génétique des mammifères.

La souris s'est rapidement imposée comme l'espèce de choix dans ce domaine, par la connaissance de son génome, par la disponibilité de nombreuses lignées consanguines (dont la génétique est parfaitement maîtrisée), par les caractéristiques de sa biologie de reproduction (courte durée de la gestation, taille des portées, nombre de portées ou de générations par an, relative facilité de transfert et de congélation des embryons) et par les performances de mise en œuvre des différentes techniques de modification génétique.

Diverses approches techniques permettent soit la génération d'une mutation ciblée (inactivation ou remplacement d'une séquence précise d'ADN), soit l'intégration d'un gène à des fins de « surexpression ». Elles autorisent des applications très largement exploitées en recherche fondamentale et pharmaceutique telles que :

- l'étude de la fonction et de la régulation des gènes et de leurs variants alléliques, l'analyse fonctionnelle du génome ;
- l'identification et la validation de nouvelles cibles thérapeutiques ;
- la production d'anticorps monoclonaux humanisés, pour usage thérapeutique ou diagnostique ;
- le développement de modèles animaux plus pertinents ou prédictifs ;

- la disponibilité de modèles animaux de pathologie humaine préalablement indisponibles, par exemple dans le domaine des maladies neuro-dégénératives ou métaboliques, de l'oncologie...

L'identification des petits animaux

Les transpondeurs électroniques sont depuis plusieurs années une méthode d'identification particulièrement fiable et peu invasive. L'identification des rongeurs de laboratoire a bénéficié récemment de la mise sur le marché de transpondeurs électroniques, destinés à être implantés sous la peau, beaucoup plus adaptés en taille (1 mm x 6 mm, implantation à l'aide d'une aiguille 18 G de 1,2 mm de diamètre) et en poids (7,15 mg) que ceux de la génération précédente.

Ils sont particulièrement utiles pour le marquage individuel précoce des souris génétiquement modifiées, qui doivent le plus souvent être identifiées individuellement dès le sevrage, avant l'étape du génotypage.

L'imagerie du petit animal

L'imagerie du petit animal est un autre domaine dans lequel les évolutions techniques, aussi rapides qu'impressionnantes, ont révolutionné les possibilités d'investigation *in vivo* et contribué de façon exceptionnelle à l'optimisation des études. Il est possible de visualiser la structure d'un organe mais aussi son fonctionnement, la présence de molécules spécifiques (les récepteurs membranaires par exemple) ou certaines voies biochimiques. La majorité des explorations réalisées chez l'Homme deviennent possibles chez le petit animal.≤

Bénéfice éthique et scientifique

Avant de pouvoir recourir à l'imagerie du petit animal, les expérimentateurs étaient souvent réduits à des observations anatomi-

ques ou histologiques *post mortem*. Le suivi longitudinal nécessitait le sacrifice des séries de sous-groupes. Outre le nombre d'animaux requis à chaque temps, il fallait tenir compte des variations individuelles liées à cette approche.

Les techniques d'imagerie permettent de travailler sur des images du « vivant » non accessibles auparavant, de pratiquer des évaluations fonctionnelles comme celle de la fonction cardiaque, et de suivre l'évolution d'une affection ou d'un traitement sur le même animal au cours du temps.

Outre la qualité de l'information collectée, ces optimisations techniques, non ou faiblement invasives, contribuent fortement à la réduction du nombre d'animaux requis et à l'optimisation des études.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM permet, par exemple, la visualisation des structures cérébrales et des lésions ischémiques ou neuro-dégénératives, des lésions d'encéphalomyélite, des signes de régénération après thérapie cellulaire...

De façon plus générale, il est possible d'améliorer la visualisation des foyers d'inflammation ou d'œdème et de suivre leur évolution en utilisant des marqueurs tels que les « *Ultra-small Particles of Iron Oxide* » (USPIO) qui sont absorbés par les cellules phagocytaires.

Dans d'autres domaines, l'IRM permet de visualiser et d'évaluer la masse grasseuse corporelle, y compris au niveau viscéral, ou encore le débit sanguin ou celui de la perfusion d'un organe sans recours à des techniques invasives. Les figures 1 et 2 illustrent deux exemples d'application de l'IRM, chez les rongeurs (fonction cardiaque) et chez le poulet (anatomie foetale).



Figure 1 : Fuite aortique. Évaluation de la fonction contractile possible par IRM (Copyright Animage).

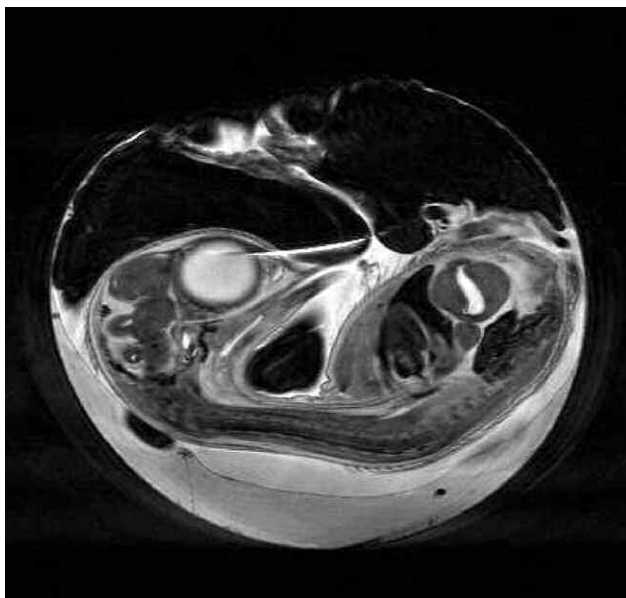


Figure 2 : Anatomie d'un fœtus de poulet, visualisé dans sa coquille par IRM haute résolution (100x100x100 µm) (Copyright « Animage »).

La tomographie par émission de positrons (TEP ou PET)

Pour les rongeurs de laboratoire, on parle de « *micro PET* ». Cette technique est basée sur l'utilisation de divers marqueurs radioactifs tels que ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O émettant des positrons.

Les cellules métaboliquement actives (par exemple les cellules tumorales ou celles des foyers inflammatoires) absorbent beaucoup plus de molécules ainsi marquées, ce qui permet de les visualiser. Néanmoins, cette technique est limitée par sa résolution spatiale de 1,30 mm dans les trois directions.

La scintigraphie ou SPECT (« *single photon emission computed tomography* »)

Cette technique est basée sur l'utilisation de radio-nucléotides utilisés comme traceurs, tels que $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I qui émettent des rayons gamma détectés par une caméra adaptée. La résolution spatiale est meilleure que celle de la TEP, mais la SPECT dispose d'un moins grand nombre de traceurs disponibles.

Il est possible, par exemple, d'étudier le remodelage osseux chez le rat par scintigraphie osseuse en utilisant du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -hydroxyméthylène diphosphonate ou HMDP (*figure 3*), un traceur également utilisé en clinique chez

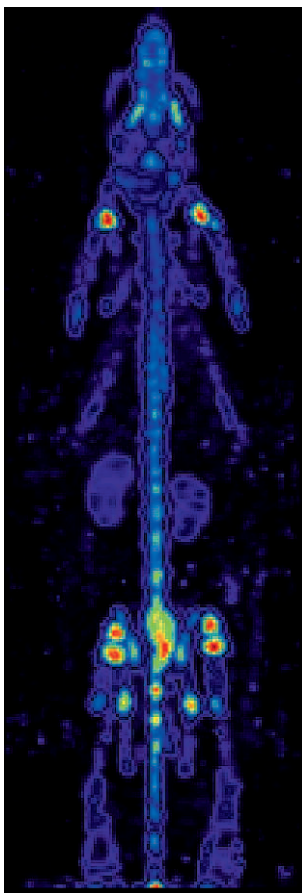


Figure 3 : Scintigraphie osseuse visualisant le remodelage osseux chez un rat, grâce au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP, traceur utilisé pour les études en clinique humaine (Copyright « Animage »).

l'homme, ou bien de visualiser les globules rouges de la souris par scintigraphie conventionnelle au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (*figure 4*).

Imagerie anatomique par rayons X

Outre la traditionnelle radiographie ou radioscopie permettant de visualiser les structures osseuses, révélées ou non par injection de produits de contraste, des équipements de type « scanner X » ou « tomographie X » permettent d'obtenir des images reconstituées en deux ou trois dimensions (*micro computed tomography*). Celles-ci permettent, par exemple, de visualiser chez les rongeurs les organes intra-thoraciques, des lésions osseuses d'arthrite rhumatoïde ou des métastases osseuses de l'extrémité distale du fémur (*figure 5*). La limite principale de ces techniques utilisant les rayonnements ionisants réside dans l'irradiation reçue par les animaux, qui peut réduire la durée du suivi longitudinal.

Les ultrasons

L'échographie, seule ou couplée au doppler, est utilisée pour visualiser l'anatomie des tissus mous, à l'exception des poumons et du cerveau, analyser la fonction contractile cardiaque et le débit du sang dans les vaisseaux. Cette imagerie est bidimensionnelle, mais en temps réel. Sa résolution dépend des sondes utilisées et permet par exemple, de suivre le développement embryonnaire et foetal chez la souris (*figure 6*).

La bioluminescence

Cette technique est basée sur l'activité d'une enzyme, la luciférase qui transforme la luciférine en oxyluciférine, en générant une émission de photons détectés par une caméra de sensibilité adaptée en chambre noire.

Un exemple d'application est la création d'une souris transgénique dans laquelle on intègre une construction associant le gène rapporteur de la luciférase au promoteur « *Myelin Basic Protein* » (MBP). L'administration de luciférine permet alors de visuali-

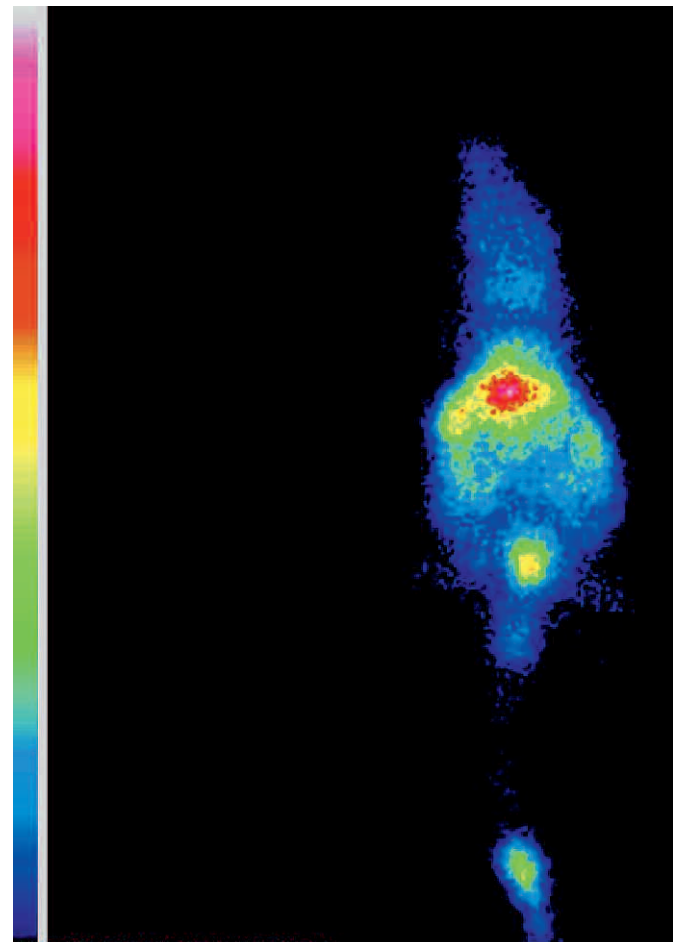


Figure 4 : Distribution des globules rouges marqués chez la souris. Scintigraphie conventionnelle avec utilisation du $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Comme indiqué par l'échelle de couleurs à la gauche du cliché, le rouge correspond à la concentration maximale (ici le cœur), le bleu à la concentration la plus faible. (Copyright « Animage »)



Figure 5 : Visualisation 3D en scanner par rayons X de métastases osseuses à l'extrémité distale du fémur (Copyright "Animage").

neuse des cellules transfectées de lymphome humain à des souris immuno-déficientes. Après un délai de développement tumoral, les effets du traitement sont comparés à l'évolution observée chez les souris témoins non traitées. La greffe orthotopique de cellules de cancer de la prostate, c'est-à-dire à l'emplacement anatomique normal de l'organe, permet le suivi de la croissance tumorale, des métastases éventuelles et de leur développement dans les différents organes, ainsi que l'étude de l'effet d'un traitement ou de l'influence des facteurs hormonaux sur la croissance tumorale.

En utilisant des traceurs fluorescents, il devient aussi possible de suivre l'activité de certaines voies enzymatiques (apoptose par exemple) ou de réaliser des études de bio-distribution de molécules candidates, comme cela est possible en imagerie isotopique TEP ou SPECT.

Utilisation combinée de techniques d'imagerie

En imagerie structurelle ou fonctionnelle, il est possible de combiner les techniques afin

ser les phénomènes de démyélinisation ou de remyélinisation, sous l'effet de traitements de protection ou de stimulation, dans le cadre de programme de recherche sur des maladies telles que la sclérose multiple.

En oncologie, selon un principe identique, des cellules tumorales ainsi transfectées (c'est-à-dire modifiées génétiquement) permettent un suivi longitudinal de la progression ou de la régression tumorale, sans sacrifice des animaux, ce qui réduit le nombre d'animaux requis. Nous en donnons deux exemples. Il est possible d'injecter par voie intravei-

de « superposer » l'image anatomique (par exemple en « *micro computed tomography* » par rayons X) avec des images de traceurs radioactifs (gamma scintigraphie, TEP) ou de bioluminescence.

Contraintes techniques liées à l'imagerie

L'accès à ces techniques est sans aucun doute un progrès majeur mais nécessitant un investissement considérable en locaux, en équipements, en compétences et en support technique.

Les techniques basées sur l'utilisation de marqueurs radioactifs doivent répondre aux contraintes de radioprotection du personnel et de l'environnement.

De plus, comme avec toutes les techniques d'imagerie vétérinaire, afin d'éviter le stress et les artefacts de mouvement, une contrainte majeure est de garantir une parfaite immobilité qui ne peut être obtenue que par une anesthésie stable et contrôlable efficacement. Chez les rongeurs, en particulier la souris, l'anesthésie doit se doubler du contrôle et du maintien de la température corporelle. Des « berceaux » destinés à recevoir des rongeurs de différente taille et connectés à un système d'anesthésie volatile et de chauffage ont donc dû être développés.

Un autre type de contrainte, plus spécifique à l'application des techniques d'imagerie en recherche, est la prise en compte et la gestion des aspects hygiéniques, afin de préserver le statut sanitaire des animaux et éviter les contaminations croisées. Cette gestion sanitaire porte en particulier sur le transfert des animaux entre les unités protégées d'hébergement et les unités d'imagerie, sur leur hébergement protégé et sur le nettoyage et la désinfection des équipements qui ont été en contact direct avec les animaux.

Enfin, outre le poids, l'encombrement et le support technique requis, le champ magnétique généré par les appareils d'IRM nécessite la mise en place de procédures de sécurité et de tra-

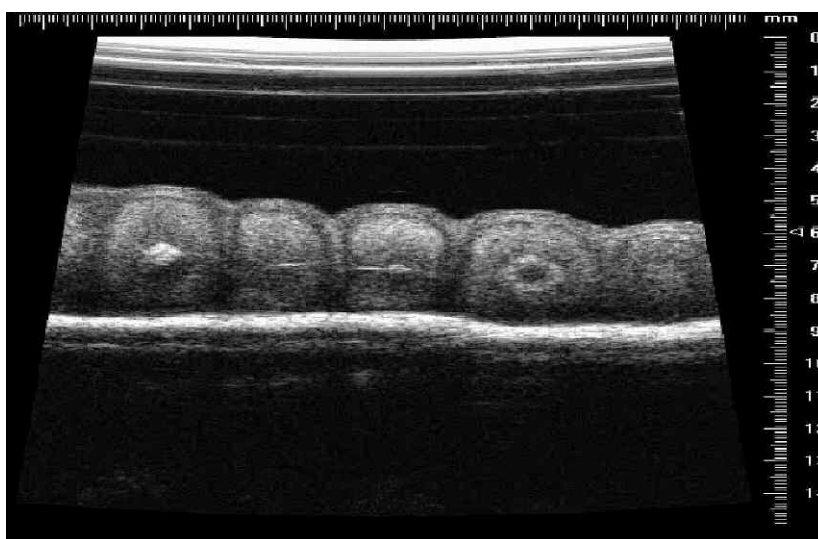


Figure 6 : Visualisation par échographie de cinq embryons dans une corne utérine de souris (Copyright « Animage »).

vail contraignantes, afin d'éviter les accidents liés à la mise en mouvement des objets métalliques (équipements, matériel...) qui peuvent exposer le personnel à des blessures ou contusions graves. Pour la même raison, il faut éviter toute utilisation chez des animaux implantés pour la télémétrie, porteurs de transpondeurs électroniques ou d'implants métalliques de chirurgie osseuse...

La télémétrie

Description et bénéfices de la technique

La télémétrie représente un autre exemple spectaculaire d'optimisation des pratiques. On peut la définir comme la transmission d'un signal à distance, entre un dispositif « capteur / émetteur de signal » et un autre « récepteur / enregistreur / analyseur de signal ».

En expérimentation animale, la télémétrie est utilisée pour enregistrer en continu des paramètres physiologiques tels que les données et tracés de pression artérielle, d'électro-cardiographie, d'électro-encéphalographie ou d'activité électrique musculaire (électro-myogramme du diaphragme, de l'intestin...), de température, d'activité...

En pratique, l'implant contenant à la fois un ou plusieurs « capteurs » (par exemple des électrodes ou des capteurs de pression) et un « émetteur », est implanté chirurgicalement. Il en

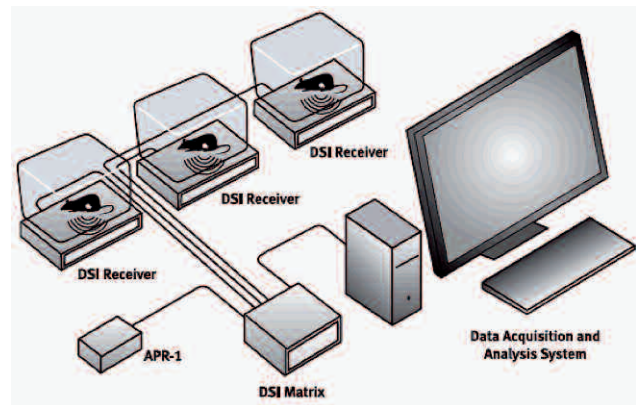


Figure 7: Configuration de télémétrie pour rongeurs implantés : les cages contenant les rongeurs implantés sont posées sur les récepteurs reliés au système d'acquisition et d'analyse des données (Copyright « Data Science International »).

existe des modèles miniaturisés destinés aux rongeurs. Selon le cas, le « récepteur » est placé sous la cage (pour les rongeurs) ou dans l'enclos (pour les gros animaux) (figures 7 et 8).

Avant de disposer de cette technique, la pratique était d'anesthésier l'animal afin de placer les cathéters de pression, les capteurs de débit ou les électrodes, puis après stabilisation des paramètres, de procéder à l'étude proprement dite. Selon le cas,

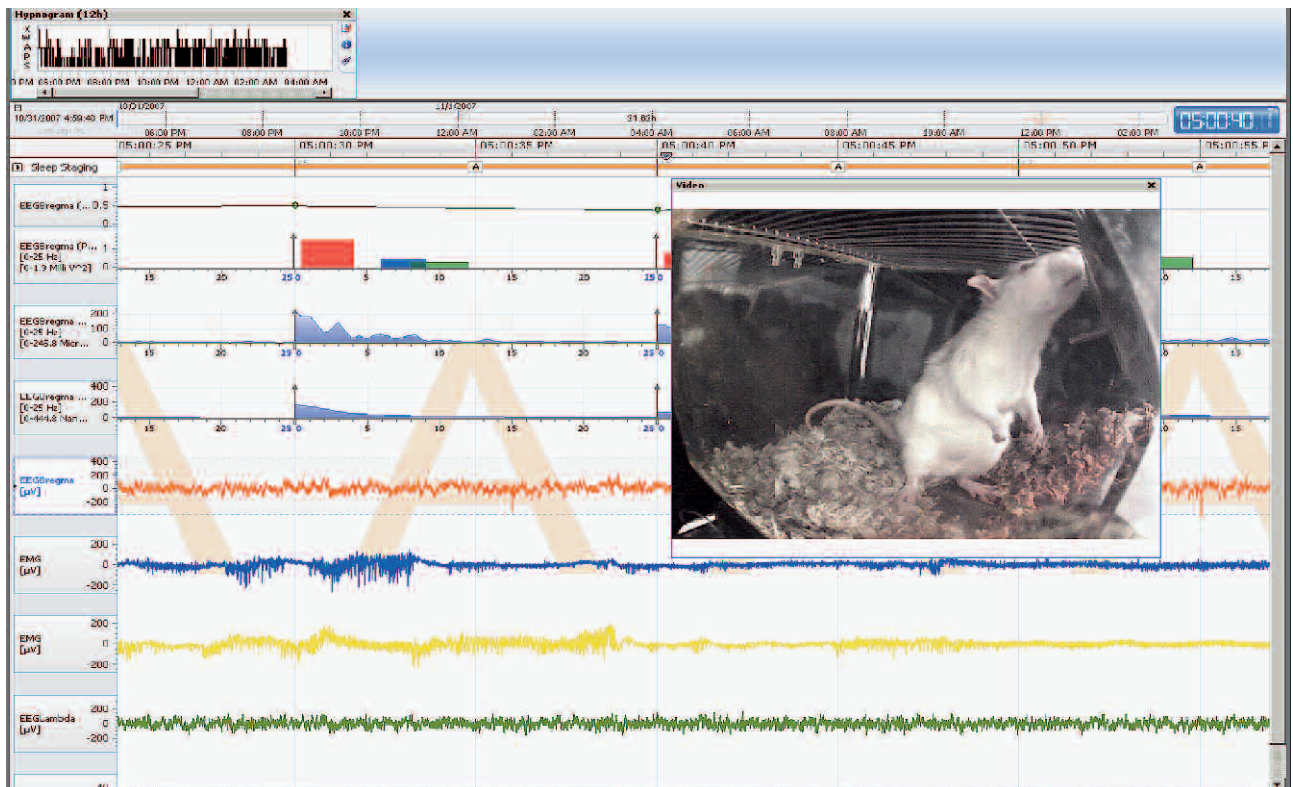


Figure 8 : Écran du système d'acquisition et d'analyse des données affichant l'image de surveillance vidéo et les divers tracés d'enregistrement des rongeurs implantés (Copyright « Data Science International »).

l'animal était maintenu sous anesthésie pendant toute la durée de l'essai ou bien, uniquement pour les implantations superficielles et peu invasives, maintenu un nombre limité d'heures dans un système de contention, par exemple un cylindre de contention pour les rongeurs; dans ce cas, les rongeurs devaient être préalablement habitués à ce système de contention afin de limiter le stress lié à son utilisation.

Le bénéfice de la télémétrie est évident: absence d'interférence liée à une anesthésie pratiquée immédiatement avant l'étude, animal vigile et maintenu dans son environnement habituel, sans limitation de la durée d'observation, qualité supérieure du signal, diminution des artefacts... Il est en outre possible de gérer de façon optimale la période postopératoire et les soins requis.

Enfin, selon le type de protocole (procédures non invasives) et sous réserve des conclusions de l'examen du protocole par le comité d'éthique (Verschuere *et al.* 2000), il est possible de soumettre un animal à plusieurs séances de mesure, ce qui permet de réduire le nombre total des animaux mis en expérimentation.

Télémétrie de « première génération » et de « seconde génération »

Jusqu'à présent, les contraintes techniques liées à la transmission du signal imposaient le maintien de l'animal en enclos ou cage individuelle pendant la période de mesure et d'enregistrement. Même en l'absence de stress de contention, et s'il est toujours possible de multiplier les séances, cet isolement inhabituel de l'animal dans un enclos de dimensions réduites limitait la durée d'enregistrement.

Les évolutions techniques récentes permettront bientôt d'éviter ces contraintes et de maintenir les animaux en groupe, dans leur enclos d'hébergement, évitant ainsi le stress de l'isolement ou celui lié aux dimensions plus restreintes de la cage d'enregistrement. Il n'y aura plus de restriction éthique à la durée d'enregistrement.

Cette « seconde génération » d'équipement de télémétrie, appelée « Jacketed External Telemetry » (JET®, Data Science International), utilise un relai placé dans un « gilet » avec une application « Bluetooth® » et un logiciel dédié (jusqu'à 36 dispositifs sont exploitables sans interférence dans un même local).

Interactions et interdépendances entre les techniques et approches expérimentales

Comme illustré dans ces exemples d'optimisation, la plupart des techniques sont interdépendantes: l'imagerie médicale requiert le recours à l'anesthésie, les approches de modification génétique sont dépendantes des techniques de reproduction assistée, l'imagerie par bioluminescence repose sur la création de souris transgéniques ou de cellules transfectées, la gestion sanitaire des rongeurs en imagerie nécessite le recours à des systèmes d'hébergement ou de transfert adaptés, le maintien continu des animaux en groupes sociaux dans des cages de dimensions optimales sera favorisé par la disponibilité prochaine des équipements de télémétrie de type « JET® ».

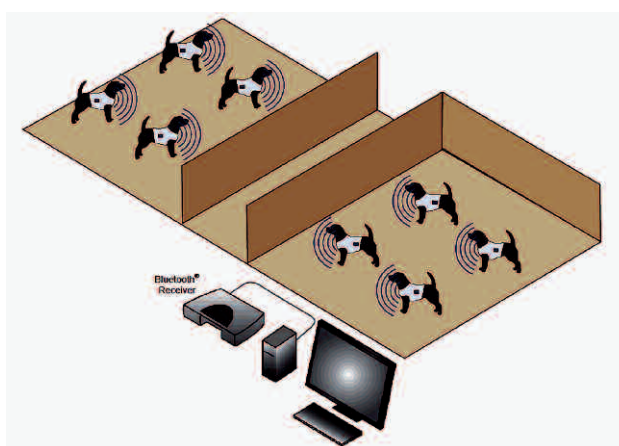


Figure 9: Configuration de type « Jacketed External Telemetry » illustrant la possibilité de maintenir les animaux dans leurs conditions habituelles d'hébergement et en groupe pendant les séances d'enregistrement (Copyright « Data Science International »).

CONCLUSIONS

À travers les exemples présentés, il apparaît que la composante « optimisation » des 3 R est un processus dynamique entretenu par une amélioration continue des pratiques visant à accroître la bien-être des animaux, et alimenté par les évolutions technologiques.

De plus, les enseignements tirés de la mise en application de ce principe d'optimisation ont permis de constater à quel point la prise en compte concrète des valeurs éthiques et du respect de l'animal est synergique des objectifs scientifiques que sont la qualité des études et les performances de la recherche.

REMERCIEMENTS

Au Dr Marc Janier (marc.janier@univ-lyon1.fr), plateforme ANIMAGE, pour les illustrations d'imagerie et ses conseils avisés;

À la société « Data Sciences International » (www.datasci.com) pour les illustrations de télémétrie;

À mon collègue et confrère, le Dr Éric Tielemans, Merial R & D Clinique EMEA, animateur du Comité « Bien-Être Animal » de notre Centre de Recherche, pour ses conseils avisés lors de la rédaction de cet article.

BIBLIOGRAPHIE

- Russell, W.M.S. & Burch, R.L., 1959. The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London, 1959 (reprinted by UFAW, 1992: 8 Hamilton Close, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QD England. ISBN 0 900767 78 2)
- Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (convention Européenne STE 123), Conseil de l'Europe.
- Directive 86/609/CEE du Conseil du 24 novembre 1986 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques.
- Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/JM/MONO(2000)7. Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation.
- Canadian Council on Animal Care. 1998. CCAC guidelines on choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching, and testing. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Canada.
- Verschuere, B., Autissier, C., Degryse A.D., Gallix, P., Gotti, B., Laurent, J., Leinot, M., Peyclit, I. 2000. Ethics committee recommendations for laboratory animals in private research in France. Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals 34 : 236-243.