



Regulations and Ethics in Animal Studies

Chrystelle PO, PhD
po@unistra.fr



Motivation

Happy animals make good science

Trevor Poole

Universities Federation for Animal Welfare, 8 Hamilton Close, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QD, UK

Summary

In this paper the question is posed whether it is not only better for the animal to be happy, but whether its state of mind may also have the potential to influence the scientific results derived from it. To ensure good science, the animal should have a normal physiology and behaviour, apart from specific adverse effects under investigation. There is a growing body of evidence from a wide variety of sources to show that animals whose well-being is compromised are often physiologically and immunologically abnormal and that experiments using them may reach unreliable conclusions. On scientific, as well as ethical grounds, therefore, the psychological well-being of laboratory animals should be an important concern for veterinarians, animal technicians and scientists.

Lab Anim. 1997 Apr;31(2):116-24. doi: 10.1258/002367797780600198

Motivation

Table 2. Examples of information to consider when reporting housing and husbandry, and their effects on laboratory animals.

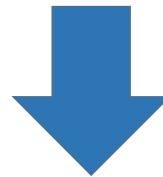
Information to report	Examples of effects on laboratory animals
Cage/tank/housing system (type and dimensions)	Affects behaviour [177] and fear learning [178]. Tank colour affects stress in aquatic species [179,180].
Food and water (type, composition, supplier, and access)	Affects body weight, tumour development, nephropathy severity [181], and the threshold for developing parkinsonian symptoms [182]. Maternal diet affects offspring body weight [183].
Bedding and nesting material	Affects behavioural responses to stress [184] and pain [185].
Temperature and humidity	Modifies tumour progression [186]. Regulates sexual differentiation in zebrafish [187].
Sanitation (frequency of cage/tank water changes, material transferred, water quality)	Affects blood pressure, heart rate, behaviour [188]. Adds an additional source of variation [189,190].
Social environment (group size and composition/stocking density)	Compromises animal welfare [191]. Induces aggressive behaviour [192,193] and stress [180].
Biosecurity (level)	The microbiological status of animals causes variation in systemic disease parameters [194].
Lighting (type, schedule, and intensity)	Modifies immune and stress responses [195].
Environmental enrichment	Reduces anxiety [196,197], stress [196,197], and abnormal repetitive behaviour [198–200]. Reduces susceptibility to epilepsy [201] and osteoarthritis [202] and modifies the pathology of neurological disorders [203]. Increases foraging behaviour in fish [204].
Sex of the experimenter	Affects physiological stress and pain behaviour [205].

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411.t002>

Ethics

Animal research is only lawful if "*it is of strict necessity*".

Scientists are "*determined to limit the use of animals for experimental purposes (...) ultimately aiming to find an alternative for this use whenever possible*".



Principle of the 3Rs

Ethics

Animal research is only lawful if "*it is of strict necessity*".

Scientists are "*determined to limit the use of animals for experimental purposes (...) ultimately aiming to find an alternative for this use whenever possible*".



REUSE 
REDUCE
RECYCLE



Ethics

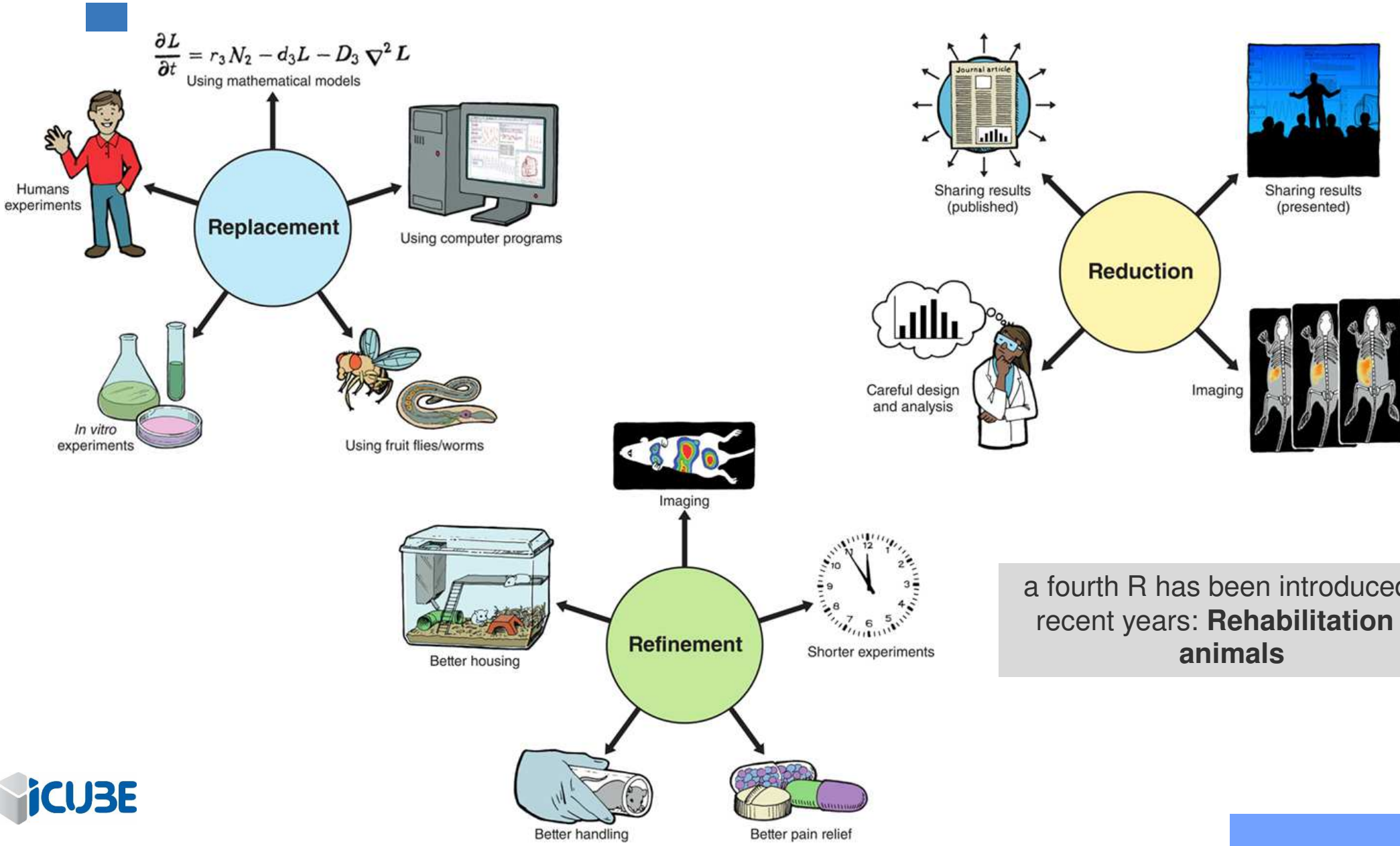
Animal research is only lawful if "*it is of strict necessity*".

Scientists are "*determined to limit the use of animals for experimental purposes (...) ultimately aiming to find an alternative for this use whenever possible*".



Principle of the 3Rs

- Replacement
- Reduction
- Refinement



a fourth R has been introduced in recent years: **Rehabilitation of animals**

Regulations

DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL

of 22 September 2010

on the protection of animals used for scientific purposes

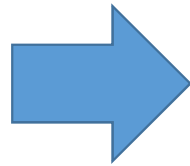


**MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'AGROALIMENTAIRE
ET DE LA FORÊT**

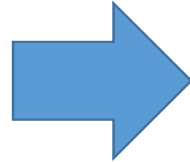
Décret n° 2013-118 du 1^{er} février 2013 relatif à la protection des animaux
utilisés à des fins scientifiques

NOR : AGRG1231951D

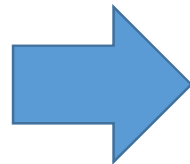
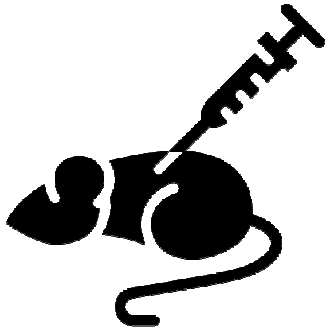
Regulations



An authorized institution conforming to requirements



Competent, trained personnel



Authorization applications for projects involving animal models

Regulations



- Granted by **prefectorial decree**, further to visits by veterinary inspectors from the *Direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations* (DDPP or DDCSPP, departmental division for social cohesion and population protection).
- Validated **for 6 years**, is dependent on the French Ministry of Agriculture, and must be renewed upon written request.
- Granted based **on compliance with housing and operational standards** defined by ministerial decree, aiming to ensure animal well-being.

Regulations



➤ sBEA : animal welfare body

Members : persons responsible for overseeing the welfare and care of the animals, scientist(s) and designated vet.

Assignments :

- Advises staff on matters related to the welfare of animals.
- Advises staff on the application of the 3Rs and keeps it informed on its technical and scientific developments.
- Establishes and reviews internal operational processes as regards monitoring, reporting and follow up in relation to the welfare of animals housed or used in the facility.
- Follows the development and outcomes of projects.
- Exchanges with project designers on possible modifications of the projects.
- Advises on rehoming schemes.

Regulations



➤ Drug managing

Who : a person with project designer level (function B)

Mission :

- Fill drug register, forgery-proof, indicating the drug flow in chronological order.
- Delivers drug doses need
- Take care to the retention and elimination.

About drugs :

- Drugs specific for animal use must be priority used (checked AMM)
- Narcotics or/and psychotropics need an authorizations to acquire and hold granted by ANSM

Regulations



➤ **Monitoring of skills**

Mission : record the followed training courses in the individual skills booklet. Prove you are up-dating in the training regulation.

➤ **Registers, procedures and housing**

Must be declared and applied :

- Registers : animals entry/exit; personal entry/exit; daily animal facility visit; ...
- Experimental procedures: injections, clinic exams, surgery, sampling, killing....
- Housing conditions

Regulations



All personnel involved in animal experimentation must undergo specific training **within a year of taking up their post** to give them the necessary qualifications to carry out their duties by making them aware of animal welfare and good experimental practices.

4 regulatory training according to the function:

- EU Function B: **designing procedures and projects**
 - Request : master level or Licence 2 + 5 years of professional experiments
 - 57h of formation
 - Can submit an authorization applications for projects involving animal models
- EU Function A: **carrying out procedures on animals**
 - 45h of formation
- EU Function C: **taking care of animals**
 - 34h of formation
- EU Function D: **killing animals** : only level A and B

Complementary regulatory training :

- **Surgery** : designer and person who realizes the surgery need for the project. Surgeons, dentists or veterinarians are exempt from this additional module
- **Per species.**

Regulations



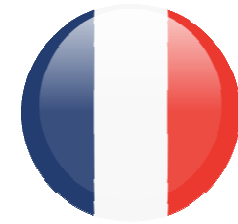
Continuous training program

- representing the equivalent of a **minimum of three days over a period of six years**, in order to ensure the maintenance and updating of their skills, and this, throughout their career.
- This training must be related to animal experimentation or the 3Rs in the form of practical and theoretical training, participation in conferences, etc.
- Participation in purely scientific conferences is not included in this framework.

The absence of training (regulatory and/or continuous) can constitute a non-compliance during the approval visit of the establishment and have **an impact on obtaining or renewing the approval, or even lead to the closure of the establishment with a 4th category fine (up to 750 €) for the person in charge of the establishment and the untrained persons**

Regulations

Authorization applications for projects involving animal models



8 weeks max.

Project granted.
Experiments start

Local ethic
committee

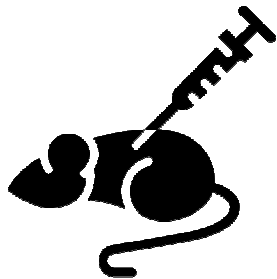
7 weeks
max.


Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

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

Regulations

Authorization applications for projects involving animal models



1. Informations Générales

Numéro de version	2
1.1. Référence Dossier	2018082915479978
1.2. Titre du projet	Imagerie optique et imagerie par rayons X sur modèles murins
1.3. Durée du projet	
Nombre d'années	5
Nombre de mois	0
Nombre de jours	0
1.4. Date prévue de début de projet	
Dès que le projet est autorisé	Oui

For Collaboration between several institution, indicate EU 1/2 or 2/2... in the beginning of title

Regulations

Authorization applications for projects involving animal models

2. Résumé non technique

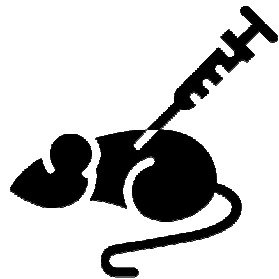
Dedicated for the general public :

- **Simple and popularized**
- Anonymous
- Project's aim
- Animal model and experimental schema (no details)
- Advantages and convenient
- Number of animals
- **3Rs respect**



Regulations

Authorization applications for projects involving animal models



3. Informations Administratives et Réglementaires

3.1. L'Etablissement Utilisateur

3.1.1. Agrément de l'Etablissement Utilisateur (EU) où seront utilisés les animaux

Nom de l'Etablissement Utilisateur _____ ICube-IPB

Numéro d'agrément _____

3.1.2. Responsable(s) de la mise en œuvre générale du projet dans l'EU et de sa conformité à l'autorisation de projet

Nombre de responsables _____ 1

Max. 3 designers (level B)

Coordonnées du responsable

Civilité _____

Nom _____

Prénom _____

Adresse Postale

Nom du laboratoire _____

Numéro _____

Voie _____

Code Postal _____

Ville _____

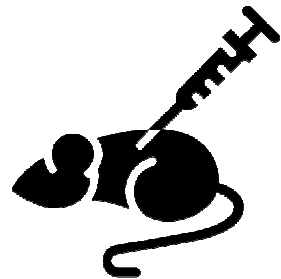
Email _____

Numéro de téléphone _____



Regulations

Authorization applications for projects involving animal models



3.1.3. Responsable(s) du bien être des animaux

Nombre de responsables _____ 1

Coordonnées du responsable

Civilité _____

Nom _____

Prénom _____

Adresse Postale

Nom du laboratoire _____

Complément _____

Numéro _____

Voie _____

Code Postal _____

Ville _____

Email _____

Numéro de téléphone _____

3.2. Le Personnel

Conception des procédures expérimentales et des projets _____ Oui

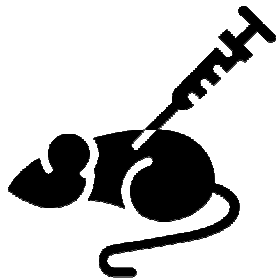
Application de procédures expérimentales aux animaux _____ Oui

Soins aux animaux _____ Oui

Mise à mort des animaux _____ Oui



Regulations



Authorization applications for projects involving animal models

3.3. Le Projet

3.3.1. Objectif du projet

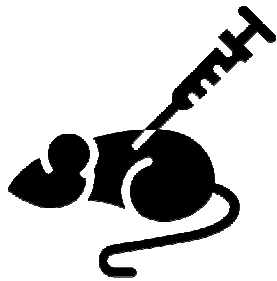
Le projet est-il

Justifié d'un point de vue scientifique ☐ Oui

Informations concernant cette(ces) justification(s)

Justifications => indicated if the project was reviewed by scientific committee (HCERES or fundings : ANR, ERC, ERAnet, ...)

Regulations



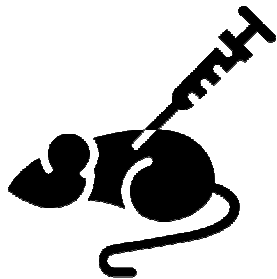
Authorization applications for projects involving animal models

3.3.2. Description du projet

The description of the project must be more technical and scientific than in the summary, while remaining understandable for non-specialists

- Introduction / context
- Aims
- Animal model description (which, how many and origin)
- Experimental schema (small description of procedures) + Annexe : chronogram
The killing of an animal is not considered an experimental procedure except for fixation procedure (intracardiac PFA injection)
- Expected results

Regulations



Authorization applications for projects involving animal models

3.3.3. Précisez, le cas échéant, la (ou les) méthode(s) de mise à mort prévue(s)

Authorized killing methods precised in annexe IV of directive 2010/63/UE.

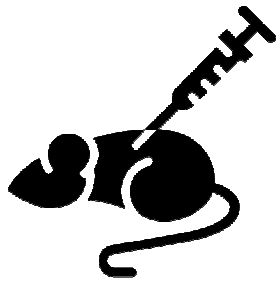
Example for mice:

- Anesthetic overdose under sedation by injection of pentobarbital solution under anesthesia
- Cervical dislocation
- Progressive inhalation of carbon dioxide in a dedicated system

3.3.4. Précisez, le cas échéant, les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation concernant la méthode de mise à mort envisagée :

In case of tissue fixation for example.

Regulations



Authorization applications for projects involving animal models

3.3.5. Stratégie d'expérimentation ou d'observation et approche statistique utilisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées, et l'impact environnemental, le cas échéant – si une étude statistique est prévue, indiquez et justifiez les tests choisis :

The **statistical approach** should be outlined here, naming the test used

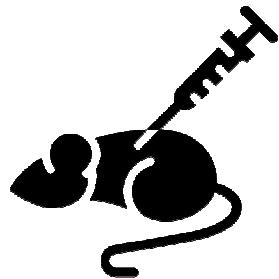
AND

the **refinements** made to reduce pain, suffering and distress to the animals, such as enrichment. Specify anesthesia and analgesia with products, dosage, volume, duration, etc.

No define limit points (to be done in procedure).

Regulations

Authorization applications for projects involving animal models



3.4. Les Animaux

3.4.1. Justifiez d'avoir recours à des animaux pour atteindre les objectifs du projet

The question is why use an animal model and no why THIS animal (mice or mini pig) (3.4.3)

3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés

Rats (*Rattus norvegicus*) ☒ Oui

3.4.3. Justifiez la pertinence de l'(des) espèce(s) choisie(s)

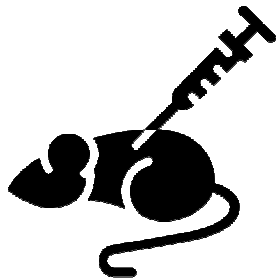
3.4.4. S'agit-il de spécimens d'espèces menacées énumérées à l'annexe A du règlement (CE) n° 338/97 du Conseil du 9 décembre 1996 relatif à la protection des espèces de faune et de flore sauvages par le contrôle et leur commerce ? ☐ Non

3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ? ☐ Non

3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ? ☐ Non

3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ? ☐ Non

Regulations



Authorization applications for projects involving animal models

3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le projet :

Animaux tenus en captivité (domestiques ou non domestiques)	Oui
---	-----

Animaux génétiquement altérés	Oui
-------------------------------	-----

Animaux génétiquement altérés

Animaux génétiquement modifiés

Création d'une lignée	Oui
-----------------------	-----

Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation	Oui
---	-----

Phénotype dommageable	Non
-----------------------	-----

damaging phenotype is an animal that is likely to experience, as a result of its genetic status, pain, suffering, distress or lasting harm at a level equivalent to or greater than that caused by the insertion of a needle performed in accordance with good veterinary practice

=> Subjective notion

Regulations

Authorization applications for projects involving animal models

3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :

Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales appartenant aux espèces dont la liste est fixée réglementairement sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'éleveurs ou de fournisseurs agréés ?

Oui

Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet 1

Etablissement éleveur

Nom de l'établissement Janvier Labs Charles River



Adresse postale

Nom du laboratoire Janvier Labs
Voie Route du Genest
Code Postal 53940
Ville Le Genest-Saint-Isle

Animaux fournis rats Wistar

Votre propre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ? Non

« Oui » if it's your animal facility institution

Un autre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ? Non

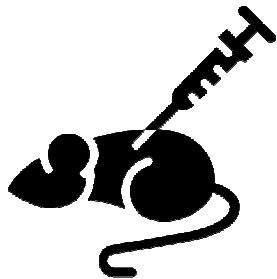
« Oui » if it's animal facility institution

Etablissements éleveurs occasionnels non agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet

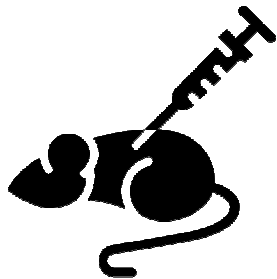
Nombre d'établissements 0

Etablissements éleveurs ou fournisseurs localisés dans des Etats membres autres que la France fournissant tout ou partie des animaux du projet

Nombre d'établissements 0



Regulations



Authorization applications for projects involving animal models

Etablissements éleveurs ou fournisseurs localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet

Nombre d'établissements 0

Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent? Non

Animaux utilisés

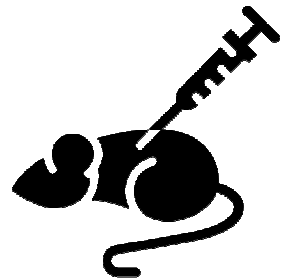
3.4.10. Nombre d'animaux utilisés dans le projet 185

Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées

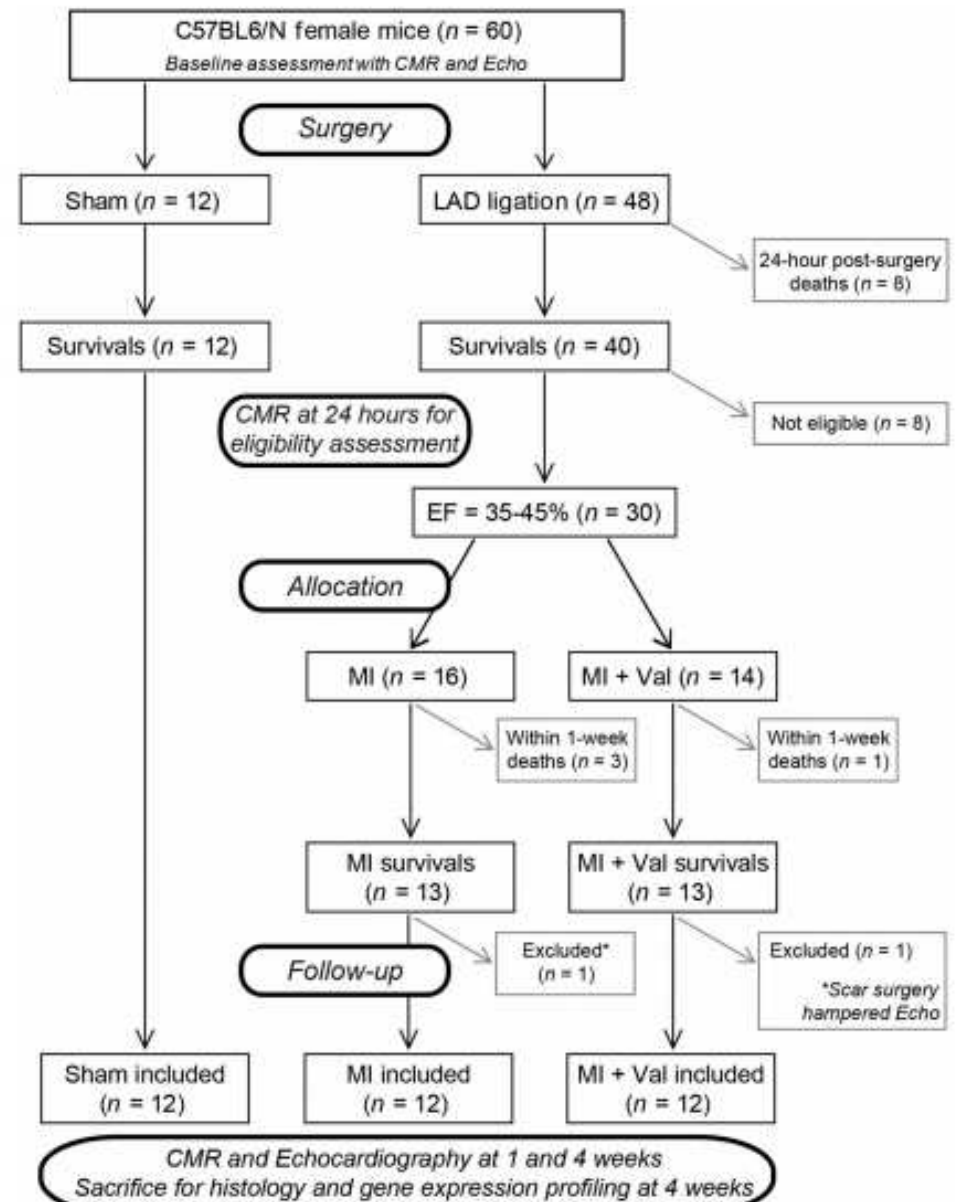
Description number of animal per group/genotype and per procedure => best way : annexe

Regulations

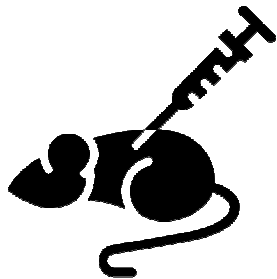
Example of annexe



	Treatment	N=	Phase I	Graft type	Phase II
Sham	SS	6	Saline	Sham	Saline
	SL	8	Saline	Sham	L-DOPA
	LS	8	L-DOPA	Sham	Saline
	LL	8	L-DOPA	Sham	L-DOPA
Allograft	SS	10	Saline	Rat VM (E14)	Saline
	SL	11*	Saline	Rat VM (E14)	L-DOPA
	LS	12	L-DOPA	Rat VM (E14)	Saline
	LL	12	L-DOPA	Rat VM (E14)	L-DOPA
Xenograft	SS	10	Saline	Mouse VM (E12)	Saline
	SL	10*	Saline	Mouse VM (E12)	L-DOPA
	LS	11*	L-DOPA	Mouse VM (E12)	Saline
	LL	12	L-DOPA	Mouse VM (E12)	L-DOPA



Regulations



Authorization applications for projects involving animal models

Etablissements éleveurs ou fournisseurs localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet

Nombre d'établissements 0

Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent? Non

Animaux utilisés

3.4.10. Nombre d'animaux utilisés dans le projet 185

Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées

Description number of animal per group/genotype and per procedure => best way : annexe

3.4.11. Indiquez à quel(s) stade(s) de développement les animaux seront utilisés et le justifier

Justified age

3.4.12. Indiquer le sexe des animaux et le justifier

Justified gender

- Males to limit the variation of physiological parameters: estrogens induce a greater variability.
- Indifferently, male or female, this pathology not being differentiated according to sex.

Regulations

Authorization applications for projects involving animal models

4. Procédures Expérimentales

4.1. Objet(s) visé(s) par les procédures expérimentales

- ☐ A - La recherche fondamentale
- ☐ B - Les recherches translationnelles ou appliquées menées pour : - la prévention, la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement de maladies, de mauvais états de santé ou d'autres anomalies ou de leurs effets chez l'homme, les animaux ou les plantes ; - l'évaluation, la détection, le contrôle ou les modifications des conditions physiologiques chez l'homme, les animaux ou les plantes ; - le bien-être des animaux et l'amélioration des conditions de production des animaux élevés à des fins agronomiques.
- ☐ C - L'une des finalités visées au point précédent (B) lors de la mise au point, de la production ou des essais de qualité, d'efficacité et d'innocuité de médicaments à usage humain ou vétérinaire, de denrées alimentaires, d'aliments pour animaux et d'autres substances ou produits.
- ☐ D - La protection de l'environnement naturel dans l'intérêt de la santé ou du bien-être de l'homme ou de l'animal.
- ☐ E - La recherche en vue de la conservation des espèces.
- ☐ F - L'enseignement supérieur, ou la formation professionnelle ou technique conduisant à des métiers qui comportent la réalisation de procédures expérimentales sur des animaux ou les soins et l'entretien de ces animaux, ainsi que la formation professionnelle continue dans ce domaine.
- ☐ G - Les enquêtes médico-légales.

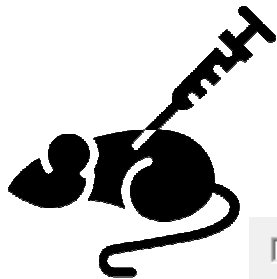
A = to be checked, most often,

B = to be checked, it is an applied research project

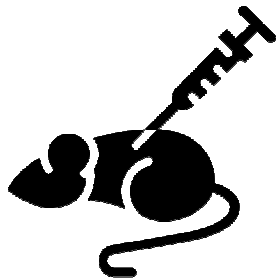
C = to be checked if B is checked and the project includes tests of pharmacological molecules or medical devices

F = to be checked only for projects of training in animal experimentation, training of surgeons,

D and E and G = specific cases



Regulations



Authorization applications for projects involving animal models

4.2. Description des procédures

Nombre de procédures

4.2.1. Procédure n°1

Nom de la procédure

Proposition de classification de la procédure selon le degré de sévérité

Classe légère, modérée, sévère ou sans réveil

The degree of severity of an procedure is determined by the intensity and duration of the pain, suffering, distress, or lasting harm that a given animal is likely to experience during the

kind of elements to be considered and weighed when assessing actual severity :

- **Procedure, technique** (surgical / non-surgical; New model or procedure)
- **Species, strain, stage of development, previous experience**

This should be a major consideration – it is necessary to understand the biology and behaviour of the species and strain (and sometimes individual) to be able to predict and assess severity effectively

- **Frequency, intensity**

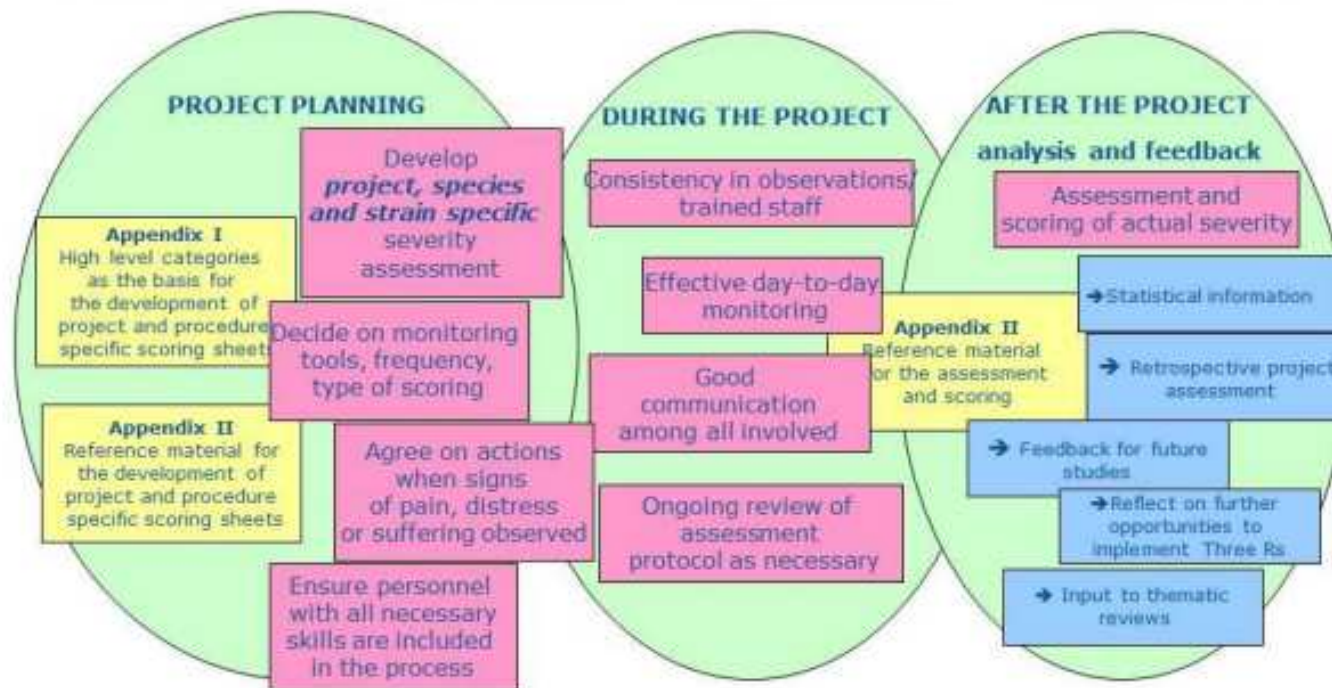
Repetition => potential acclimatization but can also increase severity

- **Duration of effect**
- **Effectiveness of refinements**
- **Cumulative severity**

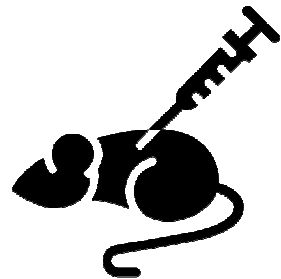
Regulations

Authorization applications for projects involving animal models

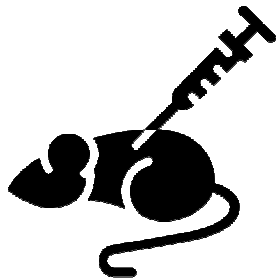
SEVERITY ASSESSMENT – A CONTINUOUS PROCESS



Example(s) of project/procedure specific severity assessment process including the day-to-day assessment sheets, scoring tools, choices of monitoring methods and final assessment should be developed.



Regulations



Authorization applications for projects involving animal models

Description détaillée de la procédure expérimentale

Pertinence et justification de la procédure expérimentale

Short introduction: why this procedure

Description of all the acts :

anaesthesia (or not)

injections : specify the products, the doses and volumes, the approach routes...

surgery : precise description

Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lot, et les justifier

Example :

This procedure concerns 180 mice divided into 4 batches of 45 mice per group :

Batch 1 = molecule X : 12.5 mg/kg per os

Batch 2 = molecule X : 25 mg/kg per os

Batch 3 = molecule Y: 2 mg/kg IV

Batch 4 = molecule Y: 2 mg/kg IV

Regulations

Authorization applications for projects involving animal models

Indiquez pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :

Really important item

The term "**endpoint**" is defined as the point at which the suffering and/or distress of an experimental animal is stopped, minimized or reduced by taking measures such as compassionately euthanizing the animal, terminating a procedure that causes it suffering, or treating it in a manner that alleviates its suffering and/or distress. The endpoints should be as early as possible to achieve the experimental objective and **adaptive to the procedure**.

Regulations

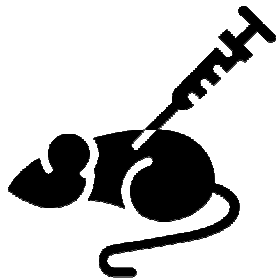
Authorization applications for projects involving animal models

Tableau des points limites : grille de score

Paramètres	Projet : Identification de l'animal :	Note	Date/heure :
Apparence	Normale	0	Remarques :
	Manque de toilettage	1	
	Pelage terne, écoulements nasaux et lacrymaux	2	
	Piloérection dos arrondi	3	
Poids	normal	0	Noté le poids : Remarques :
	Perte de poids <5 %	1	
	Perte de poids entre 5 et 15 %	2	
	Perte de poids > 15 %	5	
Comportement	Normal	0	Remarques :
	Légères modifications	1	
	Mais mobile et isolé, mais attentif	2	
	Agité ou très immobile, pas alerte	5	
	Vocalisations spontanées	5	
	automutilation	5	
Total			

score	Actions
>1	Surveillance accrue
4-9	Surveillance accrue. Contacter la vétérinaire si besoin d'un antalgique
10-15	Souffrance. Prévoir un mode de soulagement. Contacter le responsable du SBEA et la vétérinaire pour avis. Euthanasie doit être considérée
15-20	Euthanasie.

Regulations



Authorization applications for projects involving animal models

Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés

In general blood sampling. Give the path/tissue, quantity, frequency, with/without anesthesia. Don't indicate post-mortem sampling.

Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médicaments - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Indicate pain management and refinement measures taken :

- Procedure under anesthesia;
- The level of anesthesia will be regularly monitored throughout the procedure by reflex and breathing tests.
- Analgesia
- Intraoperative medication.

Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

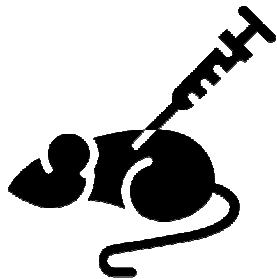
Indicate Refinement conditions and general endpoints

Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

Justify why your project is original and new (no published yet). Scientific literature will be controled during your project.

Regulations

Authorization applications for projects involving animal models



Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale

Animal gardé en vie

Oui

If another procedure in the same project use these animals

Précisez les animaux concernés

Indicate groups/genotype and number of animal

Précisez si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet

Informations

- Local “sBEA” and institution responsible
- GIRCOR : General public information about animal models in biological and medical research, fundamental and applied
<https://www.recherche-animale.org/>
- AFSTAL : French association of sciences and technics in lab animals
<http://www.afstal.com/>
- NC3Rs : help the research community use the latest science and technology to replace animal studies, providing new approaches for biomedical research and avoiding the time and cost associated with in vivo models.
<https://www.nc3rs.org.uk/>
Experimental design assistant : <https://eda.nc3rs.org.uk/>
- ARRIVE guidelines : <https://arriveguidelines.org/>
- European Commission : https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pubs_guidance_en.htm