

Conseil canadien de protection des animaux



lignes directrices:

***choisir un point limite approprié
pour les expériences faisant
appel à l'utilisation des
animaux en recherche, en
enseignement et dans les tests***

Les Lignes directrices du CCPA: choisir un point limite approprié pour les expériences faisant appel à l'utilisation des animaux en recherche, en enseignement et dans les tests ont été élaborées par le Sous-comité ad hoc sur les points limites du Comité des lignes directrices du CCPA:

Dr Ernest Olfert, University of Saskatchewan (co-président)

Dr Jag Bhasin, Conseil national de recherches (co-président)

Dr Richard Latt, McGill University

Dr Eileen Macallum, Warner-Lambert Canada Inc.

Dr Kathie McCutcheon, University of Manitoba

Dr Don Rainnie, University of Prince Edward Island

Dr Michael Schunk, Pasteur Mérieux Connaught

Le CCPA tient également à remercier les nombreuses personnes, organisations et associations qui ont généreusement contribué à la révision des ébauches antérieures des présentes lignes directrices.

1998

TABLE DES MATIÈRES

- INTRODUCTION
 - PRINCIPE DIRECTEUR GÉNÉRAL
 - PROCÉDURES RECOMMANDÉES POUR LE CHOIX D'UN POINT LIMITE APPROPRIÉ
 - a. Observer les animaux de manière appropriée
 - b. Évaluation quantitative des observations physiologiques afin de choisir et de raffiner les points limites
 - c. L'identification d'indicateurs comportementaux significatifs de souffrance et/ou de détresse
 - UTILISATION D'ÉTUDES PRÉLIMINAIRES OU PILOTES AFIN DE DÉTERMINER LES POINTS LIMITES APPROPRIÉS
 - DÉTERMINATION DE LA FRÉQUENCE NÉCESSAIRE POUR LES OBSERVATIONS DES ANIMAUX
 - DÉFINIR LES RESPONSABILITÉS RELATIVES À L'OBSERVATION DES ANIMAUX
 - FORMATION DU PERSONNEL POUR L'OBSERVATION CLINIQUE DES ANIMAUX
 - LE RÔLE DU COMITÉ INSTITUTIONNEL DE PROTECTION DES ANIMAUX DANS L'ÉTABLISSEMENT DE POINTS LIMITES
 - PRINCIPES DIRECTEURS RELATIFS AU CHOIX DE POINTS LIMITES APPROPRIÉS DANS CERTAINS SECTEURS SPÉCIFIQUES DE LA RECHERCHE BIOMÉDICALE ET DES TESTS
 - a. Production d'anticorps monoclonaux chez les rongeurs
 - b. Recherche sur le cancer
 - c. Études en toxicologie et tests de toxicité
 - i. Tests de toxicité aiguë
 - ii. Études de toxicité chronique et études du vieillissement
 - d. Recherche sur la douleur
 - e. Études des maladies infectieuses, essais cliniques de vaccins, etc.
 - f. Modèles animaux spécifiques potentiellement associés à des niveaux significatifs de souffrance et/ou de détresse
 - RÉSUMÉ
 - RÉFÉRENCES
- ANNEXE A - SIGNES SPÉCIFIQUES DE SOUFFRANCE ET/OU DE DÉTRESSE SELON LES ESPÈCES
- ANNEXE B - SIGNES DE SOUFFRANCE ET/OU DE DÉTRESSE LORS D'ÉTUDES DE TOXICOLOGIE AVEC DES POISSONS
- ANNEXE C - EXEMPLES DE LISTES DE VÉRIFICATION RELATIVES AUX OBSERVATIONS UTILISÉES POUR DÉTERMINER LES POINTS LIMITES

Lignes directrices: choisir un point limite approprié pour les expériences faisant appel à l'institution des animaux en recherche, en enseignement et dans les tests du CCPA

Le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) est responsable de la surveillance du soin et de l'utilisation des animaux en recherche, en enseignement et dans les tests. En plus du [Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation, Vol. 1, 2^e éd., 1993](#) et [Vol. 2, 1984](#), qui énonce les principes généraux de soin et d'utilisation des animaux, le CCPA publie également des lignes directrices sur [des sujets d'intérêt actuel et futur](#). Les *Lignes directrices du CCPA: choisir un point limite approprié pour les expériences faisant appel à l'utilisation des animaux en recherche, en enseignement et dans les tests* sont les troisièmes de cette série et ont été élaborées par le sous-comité *ad hoc* du CCPA sur les points limites.

L'objet du présent document est de présenter des lignes directrices relatives au choix d'un point limite qui réduise la souffrance et/ou la détresse de l'animal tout en répondant aux exigences expérimentales par des critères d'évaluation objective lorsque les animaux sont utilisés en recherche, en enseignement et dans les tests. Ces lignes directrices sont destinées à aider les membres des Comités de protection des animaux (CPA) et les chercheurs à s'acquitter de leurs responsabilités éthiques en minimisant la souffrance et/ou la détresse dans les protocoles expérimentaux.

Le raffinement de l'utilisation des animaux en recherche biomédicale, en enseignement et dans les tests est un processus graduel qui ne sera jamais terminé. Ceci est particulièrement vrai dans le cas de la recherche de points limites plus humanitaires en expérimentation animale. C'est donc non pas comme texte définitif sur les points limites humanitaires que ces lignes directrices devraient être utilisées, mais bien plutôt comme guide dans le cadre du processus évolutif de raffinement de l'expérimentation animale.

1. INTRODUCTION

La déclaration de principes du CCPA intitulée [Principes régissant la recherche sur les animaux](#) spécifie que:

«Il faut éviter de soumettre les animaux à des souffrances ou à des angoisses inutiles. La technique d'expérimentation doit leur assurer toute la protection possible, qu'il s'agisse de recherche, d'enseignement ou de techniques d'expérimentation; ...»

(Principes régissant la recherche sur les animaux, CCPA, 1989)

Les [Principes régissant la recherche sur les animaux](#) demandent également aux chercheurs de suivre le principe des «Trois R» de [Russell et Burch \(1959\)](#): Remplacement (des animaux par du matériel non doué de sensation ou par d'autres animaux moins évolués); Réduction (du nombre d'animaux utilisés); et Raffinement (de la technique, «pour réduire à un minimum absolu le niveau de détresse imposée aux animaux devant être utilisés»).

Cette déclaration de principe définit clairement les responsabilités du chercheur au niveau éthique, mais il n'en demeure pas moins certaines questions importantes auxquelles des réponses doivent être apportées. De quelle manière choisir un point limite qui satisfasse ces principes? Comment «raffiner» des expériences en établissant des points limites plus précoces et plus humanitaires dans le cas d'expériences invasives, particulièrement pour celles qui, par le passé, ont utilisé la mort comme point limite? Où faut-il établir la limite?

Dans le cadre des présentes lignes directrices, l'expression «point limite» est définie comme étant le moment auquel la souffrance et/ou la détresse d'un animal d'expérimentation est arrêtée, minimisée ou diminuée en prenant des mesures comme celles d'euthanasier de façon humanitaire l'animal, de mettre fin à une procédure qui le fait souffrir, ou en le traitant de manière à soulager sa souffrance et/ou sa détresse.

Il existe divers types d'études pour lesquelles la mort de l'animal aura auparavant été le «point limite» dans le cadre du plan expérimental, mais pour lesquelles cela est actuellement remis en question. Ces domaines comprennent la toxicologie régulatoire, la toxicologie diagnostique, les études de toxicité aiguë en recherche, les études sur les maladies infectieuses, les épreuves de virulence microbienne, les essais d'efficacité des vaccins, la recherche sur le cancer, et l'évaluation de traitements du cancer.

Pour certaines recherches, la souffrance et/ou la détresse sont les effets non souhaités de la maladie ou de l'état étudié (ex.: certains modèles de maladies humaines telles l'arthrite ou le cancer). Dans le cas de certaines utilisations expérimentales des animaux, la souffrance et/ou la détresse peuvent également être un effet secondaire découlant de l'utilisation de l'animal (ex.: la production d'anticorps monoclonaux, l'utilisation de l'adjuvant de Freund dans la production d'anticorps). Dans ces derniers cas, les points limites sont relativement faciles à définir (ex.: limiter le volume et le nombre de fois que le liquide ascitique est prélevé d'une souris), et des lignes directrices ayant trait à certaines de ces procédures existent déjà ([CCPA, 1991](#)).

2. PRINCIPE DIRECTEUR GÉNÉRAL

Dans les expériences impliquant des animaux, toute souffrance, détresse ou inconfort réel ou potentiel devrait être minimisé ou allégé en choisissant le point limite le plus précoce compatible avec les objectifs scientifiques de la recherche. Le choix de ce point limite par le chercheur devrait être effectué en consultation avec le vétérinaire des animaux de laboratoire et le comité de protection des animaux.

3. PROCÉDURES RECOMMANDÉES POUR LE CHOIX D'UN POINT LIMITE APPROPRIÉ

L'animal à l'état moribond peut avoir dépassé le seuil de douleur (et être en réalité dans le coma). Un animal moribond est un animal à l'article de la mort, qui peut être dans le coma ou ne pas répondre aux stimuli, montrer des signes de dyspnée ou d'autres problèmes respiratoires sérieux, faire de l'hypothermie, être dans un état de prostration, etc. Cependant, des observations détaillées de l'animal avant qu'il ne devienne moribond peuvent contribuer à établir un point limite plus précoce et en conséquence réduire les coûts imposés à l'animal en termes de souffrance et/ou de détresse.

Plusieurs aspects sont à considérer dans la définition d'un point limite approprié pour une expérience donnée. Ils dépendent tous de la détermination objective de toute déviation de l'état «normal» de l'animal, suivi de la corrélation de ces variations avec les degrés d'inconfort, de souffrance et/ou de détresse. Certaines de ces considérations sont:

- o observer les animaux de manière appropriée (comportement, physiologie, etc.);
- o assigner des valeurs objectives aux observations liées au comportement et à la physiologie de l'animal;
- o déterminer quelles observations sont les indicateurs les plus significatifs de souffrance et/ou de détresse dans les circonstances spécifiques de la recherche;
- o déterminer quelles observations sont les facteurs prédictifs les plus significatifs d'une détérioration plus avancée de l'état de l'animal, et identifier alors le point le plus précoce auquel ces signes se déclarent;
- o répondre aux objectifs scientifiques quant à la détermination d'un point limite objectivement mesuré et significatif;
- o définir clairement l'information/les données recherchées à travers les expériences.

a. Observer les animaux de manière appropriée

[Morton et Griffiths \(1985\)](#) ont dégagé les grandes lignes de l'élaboration d'un ensemble d'observations pour l'évaluation de la souffrance, de la détresse et de l'inconfort des animaux de laboratoire, en se basant sur l'évaluation de cinq aspects de l'état d'un animal:

- o variation du poids de l'animal (et variations connexes au niveau de l'ingestion de nourriture et d'eau);
- o apparence physique externe;
- o signes cliniques mesurables (ex.: changements du rythme cardiaque, du rythme respiratoire et de la nature de ceux-ci);
- o changement dans les comportements non provoqués; et,
- o réponses comportementales aux stimuli externes.

Dans chacune de ces catégories, un système d'évaluation avec indices de 0 (normal ou léger) à 3 (changements importants par rapport à la normale) fut proposé. L'indice cumulatif obtenu en ajoutant les valeurs de chacune des catégories indique chez l'animal une déviation croissante par rapport à la normale qui peut être interprétée comme étant une indication de souffrance et/ou de détresse croissante. Une valeur totale peut alors être identifiée, point auquel la souffrance et/ou la détresse de l'animal sera éliminée ou soulagée. Les observations énumérées par [Morton et Griffiths \(1985\)](#) ne sont que quelques-unes des observations pouvant être nécessaires à la détermination d'un point limite dans des modèles de recherche spécifiques.

En plus des mesures comportementales et physiologiques, un certain nombre d'indicateurs hormonaux ont été utilisés afin de mesurer le stress/la détresse des animaux (catécholamines, corticostéroïdes, prolactine, facteur de nécrose tumorale, interleukines) ([NRC, 1992](#)). L'opinion est loin d'être unanime quant à savoir lequel des divers changements hormonaux donne réellement une mesure de la détresse ou de la souffrance. Néanmoins, si une prise de sang fait partie du protocole de recherche, le chercheur devrait envisager d'effectuer l'analyse du sang prélevé en ce qui a trait à certains indicateurs de stress. Cette information constituerait un ajout

intéressant, et pourrait permettre d'établir une corrélation utile avec tout changement comportemental observé. Il est important de connaître le comportement caractéristique de l'espèce observée. Les animaux tels les primates non humains, les rongeurs, les lapins et certaines espèces d'animaux de ferme peuvent ne présenter que très peu de changements comportementaux malgré une souffrance intense. Les variations d'une lignée à l'autre doivent être également prises en considération. Il est donc impératif que le chercheur/observateur soit bien informé de ces caractéristiques avant de définir des points limites.

En termes concrets, l'animal devrait d'abord être attentivement observé sans être dérangé. Son apparence et sa posture devraient être observées et une évaluation faite à savoir si son comportement est normal ou non. La réaction de l'animal à un stimulus externe peut également être vérifiée (ex.: bruit, variation de l'intensité lumineuse) avant de s'approcher directement de la cage pour manipuler l'animal. Tout dépendant de l'espèce, l'animal devrait être manipulé pour l'examen clinique. Durant celui-ci, les signes cliniques sont notés et des mesures prises (dont celle du poids de l'animal). Toute lésion ou anomalie est également évaluée à ce moment-là (ex.: taille de la tumeur). Pendant l'examen clinique, des «comportements provoqués» peuvent également être évalués.

L'utilisation de «listes de vérification» observationnelles pour évaluer de manière quantitative l'état de l'animal utilisé dans une étude fournit une base objective sur laquelle peuvent être prises des décisions quant aux points limites. Les avantages des listes de vérification résident en ceci que les observations spécifiques ne sont pas oubliées ou prises comme allant de soit. L'autre avantage réel est que de telles listes de vérification aident à améliorer les capacités d'observation, particulièrement en ce qui a trait aux petits animaux de laboratoire pour lesquels certaines observations cliniques conventionnelles faites sur de plus grands animaux ne sont pas facilement déterminées (ex.: température, rythme cardiaque, rythme respiratoire). Toutefois, les listes de vérification ne couvrent pas toutes les anomalies ou observations et ne constituent donc qu'un moyen facile d'enregistrer certains résultats. Elles ne peuvent pas remplacer un examen approfondi de l'animal.

[Morton et Griffiths \(1985\)](#), et [Sanford et al. \(1986\)](#) ont mis l'accent sur la nécessité de faire des évaluations plus objectives de la souffrance et/ou de la détresse qui peuvent se produire chez l'animal utilisé en recherche biomédicale. Depuis 1985, des efforts n'ont cessé d'être faits pour raffiner l'évaluation quantitative des signes cliniques ([Morton, 1990](#); [Morton et Townsend, 1995](#); [Workman, et al., 1998](#)). Des listes de vérifications observationnelles plus détaillées ont été proposées pour certaines procédures scientifiques spécifiques, en particulier pour l'administration d'endotoxine chez la souris ([Townsend et Morton, 1994](#)), la production d'anticorps monoclonaux chez la souris ([Morton, 1997](#)), et la recherche sur le cancer ([Workman, et al., 1998](#)).

En plus des signes généraux de souffrance et/ou de détresse, existent les symptômes et signes spécifiques liés à l'état étudié. Pour la plupart des modèles animaux de maladies, l'information sur le(s) organe(s) affecté(s), les symptômes spécifiques, la progression des symptômes, l'évolution de la maladie et les lésions prévues, existe dans la littérature médicale comparative et vétérinaire générale (ex.: [Armed Forces Institute of Pathology \[AFIP\] Fascicles](#)). Ces symptômes et signes spécifiques doivent également être utilisés dans l'évaluation globale de l'état de l'animal.

Les résultats d'études pilotes ou d'informations précédemment publiées, ainsi que l'information sur la pharmacologie ou la chimie des produits testés devraient être utilisés afin de prédire tout effet négatif pouvant affecter les animaux. Ceci implique nécessairement qu'une recherche bibliographique complète ait été faite.

b. Évaluation quantitative des observations physiologiques afin de choisir et de raffiner les points limites

De l'information sur les signes généraux de souffrance et de détresse pour les diverses espèces communément utilisées en recherche biomédicale est à la disposition de tous ([CCPA, 1993](#); [Sanford, et al., 1986](#); [Wallace, et al., 1990](#)). Parmi ces signes, une perte de poids significative peut être l'un des signes de détérioration de l'état de l'animal les plus importants (reflétant un changement dans l'ingestion de nourriture et d'eau). Une perte de poids dans ces circonstances doit toujours être évaluée par rapport à l'animal témoin approprié. Des tableaux d'évaluation quantitative de la condition physique, disponibles pour le bétail domestique, les chiens et les chats, peuvent être utiles dans l'évaluation de la perte de poids chronique chez les animaux d'expérimentation lors d'études spécifiques.

L'hypothermie peut également être un indicateur important de détérioration de l'état de l'animal, dans le cas de maladies ou d'états toxiques spécifiques. [Wong, et al. \(1997\)](#) ont montré que chez des souris infectées avec le virus de la grippe, une température corporelle de moins de 32 °C était prédictive de mortalité. [Soothill, et al. \(1992\)](#) ont montré que chez des souris avec une infection bactérienne, une hypothermie de 34 °C était prédictive de mortalité. Par conséquent, dans des cas expérimentaux particuliers, le point auquel la température corporelle de l'animal d'expérimentation chute à une température spécifiée, pourrait être établi comme point limite auquel l'euthanasie de l'animal est recommandée.

Le rapport d'un comité de la [British Laboratory Animal Science Association \(Wallace, et al., 1990\)](#) inclut une évaluation de la sévérité de procédures couramment effectuées sur les animaux lors d'études biomédicales. D'autres publications sont également disponibles pour faciliter l'identification des signes et symptômes de la souffrance et/ou de la détresse des animaux d'expérimentation ([Barclay, et al., 1988](#); [Baumans, et al., 1994](#); [British Veterinary Association, 1985](#); [Butler, et al., 1985](#); [De Castro Costa, et al., 1981](#); [Flecknell, 1994](#); [Keefe, et al., 1991](#); [Wolfensohn et Lloyd, 1994](#); [Soma, 1987](#)).

c. L'identification d'indicateurs comportementaux significatifs de souffrance et/ou de détresse

Pour tout modèle animal, nombreuses sont les observations et mesures qui peuvent être faites. Déterminer lesquelles constituent les indicateurs les plus importants ou les plus significatifs quant à l'état de l'animal, ou ce qui est plus important pour le scientifique, quels sont les indicateurs les plus importants d'une détérioration irréversible de l'état de l'animal, n'est pas une tâche facile. Les études de [Butler, et al. \(1985\)](#) et de [De Castro Costa, et al. \(1981\)](#), qui se penchent sur le modèle de l'arthrite induit par adjuvant chez le rat, donnent un aperçu des difficultés rencontrées pour trouver/choisir les bonnes observations. Bien que des changements furent notés dans la fréquence de l'occurrence de plusieurs types de comportements

(les rats se cabraient, couraient, mangeaient, buvaient et grimpaient moins mais se reposaient, s'immobilisaient et se grattaient plus), la conclusion fut que l'augmentation du grattage fut le changement comportemental le plus significatif lié au développement de l'arthrite, indiquant une douleur chronique.

De telles évaluations comportementales (Butler, *et al.*, 1985; De Castro Costa, *et al.*, 1981) sont en soit des projets de recherche, nécessitant de nombreuses heures de travail technique ainsi que de l'équipement coûteux de surveillance et d'analyse. Il peut sembler peu réaliste d'exiger un niveau semblable d'évaluation préliminaire chaque fois qu'un programme de recherche utilisant des animaux d'expérimentation pour lesquels le niveau potentiel de souffrance et/ou de détresse est élevé (par exemple, des souris utilisées dans un projet de recherche sur le cancer du foie) est lancé. Néanmoins, faire une étude pilote pour établir les critères observationnels devant être utilisés pour établir des points limites peut s'avérer un exercice très utile, en particulier au début d'un projet de recherche.

4. UTILISATION D'ÉTUDES PRÉLIMINAIRES OU PILOTES AFIN DE DÉTERMINER LES POINTS LIMITES APPROPRIÉS

L'utilisation d'études préliminaires ou pilotes peut s'avérer très utile pour la détermination des points limites ([Olfert, 1995](#); [Browder, 1995](#), [Everitt et Griffin, 1995](#)) particulièrement lorsque les effets du traitement sur les animaux sont inconnus. Une étude pilote utilisant un nombre restreint d'animaux peut aider à déterminer la morbidité, la durée des effets, et la fréquence des observations nécessaires à l'établissement d'un point limite plus précoce. Une étude pilote peut également donner une indication de la variance des réponses entre les groupes de traitement, laquelle peut être alors utilisée pour estimer plus précisément la taille appropriée des groupes de l'étude principale. De plus, mener une expérience pilote offre à tous l'occasion de se familiariser avec les signes et symptômes attendus.

5. DÉTERMINATION DE LA FRÉQUENCE NÉCESSAIRE POUR LES OBSERVATIONS DES ANIMAUX

Principe directeur: En tenant compte de ce qui est connu, pendant les périodes critiques de l'expérience ainsi qu'au début des réactions négatives, un minimum de deux à trois observations devraient être faites quotidiennement. La fréquence des observations devrait augmenter en fonction de l'augmentation potentielle de la souffrance et/ou de la détresse.

Le [Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation du CCPA](#) spécifie que les animaux d'expérimentation normaux et en santé devraient être observés au moins une fois par jour ([CCPA, 1993](#)). Cependant, dès que l'animal se trouve dans une période potentiellement critique d'affaiblissement, des observations doivent être faites plus fréquemment.

La fréquence à laquelle les animaux affectés devraient être observés doit être déterminée pour chaque étude. La fréquence nécessaire des observations et l'intervalle entre celles-ci vont dépendre de la durée connue ou prévue de l'état. Par exemple, dans certains cas d'infections et/ou de toxicité, des observations bien plus fréquentes (toutes les heures) peuvent être nécessaires pour identifier le point auquel le «point limite» choisi a été atteint et il doit être mis fin à la souffrance et/ou à la détresse de l'animal ([Morton et Townsend, 1995](#); [Townsend et Morton, 1994](#)). Programmer l'étude afin que

la période critique pour les animaux ait lieu durant les heures normales de travail (lorsque la pièce des animaux est éclairée) peut aider à garantir que les observations appropriées soient faites.

L'horaire approprié de surveillance devrait être établi par le chercheur en consultation avec le vétérinaire et approuvé par le CPA lors de sa révision du protocole.

6. DÉFINIR LES RESPONSABILITÉS RELATIVES À L'OBSERVATION DES ANIMAUX

Principe directeur: En ce qui concerne l'établissement et la détermination des points limites, la(les) responsabilité(s) de chacun devrai(en)t être clairement définie(s) et un suivi ordonné du rapport des observations bien établi. Le pouvoir décisionnel final quant à l'euthanasie doit revenir au vétérinaire appuyé par le comité de protection des animaux.

Il est essentiel qu'une personne ayant l'expérience et la formation appropriées ainsi que le pouvoir d'euthanasier ou de demander l'euthanasie des animaux soit constamment disponible pendant l'étude. Toute observation faite d'un comportement inhabituel ou de signes de souffrance et/ou de détresse devrait être rapportée immédiatement à cette personne. Ceci est également important afin de réagir dans le cas où les animaux présentent des réactions négatives inattendues dans le cadre d'une étude invasive. Le pouvoir d'euthanasier des animaux qui ont atteint le point limite ou qui subissent de graves effets négatifs non-prévus devrait être clairement défini avant que l'étude ne commence. Le pouvoir ultime d'euthanasier doit demeurer entre les mains du vétérinaire de l'institution ([ACMAL, 1990](#)).

7. FORMATION DU PERSONNEL POUR L'OBSERVATION CLINIQUE DES ANIMAUX

Principe directeur: Toute personne responsable des observations à faire sur les animaux, à partir desquelles un point limite sera déterminé, devrait avoir les compétences nécessaires pour évaluer la physiologie, le comportement et l'état physique normaux des animaux observés ainsi que les changements spécifiques anticipés déviant de la normale.

Il revient au chercheur principal ou au directeur d'étude (et en dernier lieu au CPA) de s'assurer que toutes les personnes impliquées ont la formation nécessaire correspondant à leurs responsabilités dans l'observation des animaux. Des preuves à l'appui de la formation devraient en outre être fournies.

8. LE RÔLE DU COMITÉ INSTITUTIONNEL DE PROTECTION DES ANIMAUX DANS L'ÉTABLISSEMENT DE POINTS LIMITES

Le rôle du CPA est vital dans l'établissement de la structure nécessaire pour garantir que les points limites les plus précoces, compatibles avec la production de données fiables sont identifiés, évalués et utilisés. Ceci relève de la responsabilité conjointe du CPA, du chercheur et du personnel vétérinaire. Afin d'assurer l'établissement d'un point limite approprié, les CPA devraient s'informer des points suivants:

- o quelles sont les justifications scientifiques de l'utilisation du point limite proposé?

- quelle est la durée prévue d'utilisation des animaux, du traitement initial aux premiers signes de souffrance/détresse jusqu'à la mort de l'animal, d'après l'information disponible sur le modèle spécifique à l'étude?
- quand est-il prévu que les effets se manifesteront le plus gravement sur l'animal?
- si le cours de la maladie et les signes prévus des effets négatifs sont inconnus, une étude pilote pourrait-elle, sous l'observation attentive du chercheur et/ou du personnel vétérinaire des animaux de laboratoire, répondre à ces questions?
- une liste de vérification des observations à partir de laquelle le point limite sera établi a-t-elle été dressée?
- qui surveillera les animaux (identifier tous les responsables) et tiendra les registres?
- un suivi ordonné de rapport des observations a-t-il été établi?
- quelles seront les fréquences d'observation des animaux: a) durant le cours de l'étude; et b) pendant les périodes critiques pour les animaux?
- les chercheurs, le personnel technique et de soin animalier ont-ils la formation et l'expertise nécessaires pour surveiller adéquatement les animaux?
- quelles dispositions ont été prises pour s'occuper des animaux qui montrent des symptômes et signes graves non prévus?
- pour des études en toxicologie, les données toxicologiques existantes ont-elles été considérées?

9. PRINCIPES DIRECTEURS RELATIFS AU CHOIX DE POINTS LIMITES APPROPRIÉS DANS CERTAINS SECTEURS SPÉCIFIQUES DE LA RECHERCHE BIOMÉDICALE ET DES TESTS

Cette section donne des lignes directrices plus détaillées quant au choix d'un point limite approprié dans certains domaines spécifiques de la recherche biomédicale et des tests. Des lignes directrices sur les points limites pour les animaux utilisés dans la production d'anticorps monoclonaux, la recherche sur le cancer, la toxicologie, l'étude des maladies infectieuses et la recherche sur la douleur sont présentées. Ce ne sont cependant pas les seuls domaines dans lesquels des lignes directrices spécifiques peuvent être élaborées en utilisant l'expertise du vétérinaire pour animaux de laboratoire de l'institution et la surveillance du CPA.

a. Production d'anticorps monoclonaux chez les rongeurs

Principe directeur: Tant que les rongeurs seront utilisés dans la production d'anticorps monoclonaux, les points limites suivants devront être établis:

- l'augmentation du poids due à l'accumulation de liquide ascitique dans l'abdomen et/ou à la croissance d'une tumeur ne devrait pas produire de souffrance et/ou de détresse chez l'animal;
- selon l'état du rongeur, un maximum de deux ponctions de liquide ascitique sont permises, et la deuxième ponction devrait être une procédure terminale. Les ponctions de liquide ascitique devraient être faites sous anesthésie générale.

Il est largement reconnu que la production d'anticorps monoclonaux (AcM) chez les rongeurs soulève plusieurs questions préoccupantes concernant le potentiel de souffrance et/ou de détresse grave chez les animaux. En regard du développement rapide et largement disponible de la méthodologie de production *in vitro* des AcM, l'utilisation des animaux à cet effet est de plus en plus difficile à justifier. Par conséquent, plusieurs pays ont pris position sur le fait que les méthodes alternatives

in vitro devraient être utilisées pour la production d'AcM et que la méthode du liquide ascitique de la souris ne peut être justifiée (auprès d'un CPA) que dans des circonstances particulières (ex.: lorsque la méthode *in vitro* n'a pas permis de produire les anticorps voulus). Récemment, certains pays ont pris la décision de bannir la méthode du liquide ascitique de la souris ([Shalev, 1998](#)). Le CCPA encourage l'utilisation des méthodes de production d'AcM *in vitro* dans tous les cas où elle peut être utilisée.

À diverses étapes de la production des anticorps, de l'injection intrapéritonéale de l'agent d'amorçage à l'accumulation de liquide ascitique tumoral, et jusqu'au prélèvement du liquide ascitique, l'animal peut éprouver de la souffrance et/ou de la détresse. Par conséquent, lorsque des anticorps monoclonaux sont produits *in vivo*, des limites et des points limites précisément définis pour l'application des diverses manipulations, ainsi qu'une surveillance rigoureuse de l'état des animaux, sont nécessaires afin de minimiser le potentiel de détresse.

Après l'injection des hybridomes, des observations quotidiennes faites par du personnel bien formé devraient faire partie des soins de routine durant la première semaine et avant que l'accumulation de liquide ascitique ne soit évidente (indiquée par le gonflement de l'abdomen). Toute observation d'un comportement ou de symptômes inhabituels pendant cette période devrait être traitée sans délai. Les signes caractéristiques de détresse comprennent: une diminution de l'activité; le dos voûté, des poils ébouriffés, une détresse respiratoire, une perte de poids (qui peut être masquée par l'accumulation de liquide dans l'abdomen). Dès que l'accumulation de liquide ascitique résulte en un gonflement abdominal évident, l'état de l'animal doit être évalué au moins deux fois toutes les 24 heures à intervalles réguliers.

La production d'AcM chez les rongeurs est un excellent exemple de la façon dont le **remplacement** des rongeurs par des méthodes *in vitro*, et le **raffinement** des procédures par l'établissement de points limites peuvent réduire la détresse éprouvée par les animaux. Pour un compte rendu et une bibliographie sur la production d'anticorps et les méthodes alternatives, se référer à [Smith, et al., 1997](#). Les raffinements et les points limites dans la production d'AcM chez les rongeurs sont revus par [Gillette, 1987](#); [Marx, et al., 1997](#); [McGuill et Rowan, 1989](#); [Mueller, et al., 1986](#); et [Workman, et al., 1998](#).

b. Recherche sur le cancer

Principe directeur: Pour toute recherche sur le cancer faisant appel à des modèles animaux, des points limites devraient être établis afin de minimiser le potentiel de souffrance et/ou de détresse chez les animaux.

Voici quelques-uns des points limites recommandés:

- la masse de la tumeur ne devrait augmenter ni au point d'interférer significativement avec les fonctions normales du corps ni au point d'induire, du fait de son emplacement, une souffrance et/ou une détresse (tumeurs solides);
- une perte de poids dépassant 20 % du poids du corps d'un animal normal semblable (en tenant compte de la masse tumorale);
- ulcération/infection à l'emplacement de la tumeur;
- envahissement des tissus voisins par une tumeur localisée;
- trauma auto-induit persistant.

La charge tumorale ne devrait pas excéder 5 % du poids normal de l'animal lors de passages de routine de tumeurs ou 10 % pour les animaux sujets d'expériences thérapeutiques (pour une tumeur sous-cutanée du flanc, 10 % correspondent typiquement à un diamètre de 17 mm pour une souris de 25 g, ou de 35 mm pour un rat de 250 g). Des courbes d'étalonnage devraient être établies dans le cadre de la caractérisation de tout nouveau système tumoral ([Workman, et al., 1998](#)).

L'une des préoccupations scientifiques ayant été exprimée au sujet de l'établissement arbitraire d'un point limite lors de recherches en oncothérapie est que l'euthanasie précoce de l'animal peut affecter les données de survie ou de longévité, lesquelles constituent des indicateurs importants d'un traitement «fructueux». Par exemple, un traitement «fructueux» du cancer chez le rat permettant à ce dernier de vivre un mois de plus, peut être voilé par une euthanasie précoce basée sur les observations cliniques. [Workman, et al. \(1998\)](#) recommande que l'information requise sur la réponse à la thérapie soit obtenue par une mesure du temps nécessaire à la recroissance de la tumeur, un test clonogénique après l'excision de la tumeur ou un autre point limite approprié. Dans de tels cas, il est important de déterminer les signes de maladie et de détresse indiquant une détérioration irréversible de l'animal.

[Redgate, et al. \(1991\)](#) dans leur étude d'un modèle de tumeur au cerveau chez le rat (gliosarcome 9L chez des rats Fischer 344), ont conclu qu'une corrélation forte existait entre une perte de poids durant plus de six jours et une progression irréversible vers la mort. Dans ce modèle, un point limite qui réponde aux préoccupations scientifiques pouvait être ainsi établi à la fin d'une période de six jours consécutifs de perte de poids, ce qui dans ce cas correspondait à dix jours avant la mort de l'animal.

Le document du United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) ([Workman, et al., 1998](#)) contient un examen détaillé des nombreux facteurs de bien-être devant être considérés lorsque la recherche sur le cancer est entreprise, et donne de précieux renseignements à l'intention des chercheurs et membres des CPA. Des critères supplémentaires relatifs au choix d'un point limite dans la recherche sur le cancer et en toxicologie ont été proposés par [Montgomery \(1987, 1990\)](#), [Redgate, et al. \(1991\)](#), et [Tomasovic, et al. \(1988\)](#).

c. Études en toxicologie et tests de toxicité

i. Tests de toxicité aiguë

Principe directeur: Avant qu'un protocole incluant des tests de réglementation liés à la sécurité/ efficacité/toxicité pour lesquels la mort est le point limite ne soit accepté, le chercheur doit obtenir pour le comité institutionnel de protection des animaux, de la documentation claire auprès de l'agence de réglementation pertinente indiquant que le test proposé forme une partie nécessaire de la soumission effectuée pour obtenir un permis/un avis de conformité de l'agence. Le chercheur doit également prouver au CPA qu'un test alternatif *in vitro* ne peut être accepté par l'agence de réglementation, et que les tests proposés n'ont pas été effectués auparavant.

Dans la plupart des études toxicologiques, le chercheur s'intéresse à l'(aux) interaction(s) primaire(s) ou secondaire(s) du composé avec les cellules et tissus du corps, et non aux effets tertiaires (tels que la déshydratation, l'anorexie, etc.) qui peuvent provoquer la mort de l'animal. Par conséquent, d'un point de vue scientifique, il est important de recueillir autant de données que possible lorsque les essais cliniques en sont aux stades préliminaires. Toute donnée recueillie sur un animal moribond ou toute mort non-observée d'un animal représente une perte d'information quant au composé étudié ([Toth, 1997](#)).

Principe directeur pour des normes acceptables de tests: Les tests de toxicité doivent être effectués conformément aux lignes directrices de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques), de la International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (Conférence internationale sur l'harmonisation des critères techniques relatifs à l'enregistrement des médicaments pour l'utilisation humaine), de Santé Canada (SC), ou de la Food and Drug Administration (FDA) des É.U., en utilisant le moins d'animaux possible et en offrant le maximum de considération afin de soulager leur souffrance et/ou leur détresse.

Au début d'une étude toxicologique, peu d'informations s'avèrent généralement disponibles sur les composés à tester. Néanmoins, il peut se trouver des données sur la classe de composés, ou sur des composés de structure chimique semblable qui peuvent être utilisées à titre de guide dans la préparation du plan expérimental. Ces études ont pour but d'établir les doses et les effets d'une administration unique ou répétée, la toxicité et/ou les réponses pharmacologiques exagérées.

L'utilisation d'études pilotes pour la détermination de points limites ([Olfert, 1995](#); [Browder, 1995](#); [Everitt et Griffin, 1995](#)) est d'une grande valeur lorsqu'il s'agit d'étudier des composés dont les effets sont inconnus. En utilisant un petit nombre d'animaux et en commençant avec les plus faibles doses, la morbidité, la durée des effets et la fréquence des observations nécessaires afin d'établir des points limites plus précoces pourraient être déterminées. Si les données colligées lors d'études pilotes établissant des points limites plus précoces dans le cadre d'études spécifiques de toxicité étaient fournies aux agences de réglementation, elles pourraient aider ces dernières à valider et à approuver des points limites plus précoces. Tel que noté précédemment, faire une expérience pilote donne également la possibilité à chacun de gagner en expérience quant aux signes et symptômes particuliers attendus.

Les études de détermination des doses minimales et maximales sont largement utilisées dans les programmes pharmaceutiques de recherche en toxicologie. Les doses sont choisies d'après les données pharmacologiques, les caractéristiques pharmaco-cinétiques et les données connues relatives à la classe de médicaments à l'étude. Ces études donnent également une indication des organes cibles potentiels, et des effets négatifs imprévus pouvant être examinés lors d'études ultérieures tandis qu'elles réduisent de façon significative le nombre d'animaux nécessaires.

L'initiative de l'industrie pharmaceutique, sous la forme d'une conférence internationale (International Conference on Harmonization of Technical

Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (Conférence internationale sur l'harmonisation des critères techniques relatifs à l'enregistrement des médicaments pour l'utilisation humaine)) pour se pencher sur ce sujet a été organisée dans le but de faire des recommandations sur les manières d'atteindre une meilleure harmonisation dans l'interprétation et l'application des lignes directrices techniques et des exigences quant à l'enregistrement des produits de façon à réduire ou à prévenir la nécessité de dupliquer les tests faits pendant la recherche et le développement de nouveaux médicaments. Après le premier congrès de l'ICH (1991), et dans les lignes directrices qui en ont découlé relativement aux tests de toxicité à dose unique ou doses répétées, il fut recommandé d'un commun accord que l'utilisation de DL₅₀ (dose létale 50) soit abandonnée pour les produits pharmaceutiques. Bien qu'une évaluation de la toxicité aiguë soit nécessaire, une dose DL₅₀ calculée ne l'est pas (Federal Register, 61(166), Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals; Revised Guidance).

Parallèlement, l'OCDE déconseille l'utilisation du test DL₅₀ classique et recommande l'utilisation d'alternatives qui réduisent l'utilisation du nombre d'animaux et utilisent comme point limite la morbidité plutôt que la mortalité ([OCDE, 1987](#)). Les recommandations du Interagency Research Animal Committee ([IRAC, 1993](#)) des É.U. sur la DL₅₀ spécifient que:

1. Le test DL₅₀ classique ne devrait être effectué que lorsqu'il est spécifiquement justifié pour des exigences scientifiques et qu'il est approuvé par le Comité institutionnel de protection des animaux (institutional animal care and use committee (IACUC)).
2. Les procédures de tests de toxicité basées sur les principes de réduction et de raffinement (tel que le "Limit test") devrait être utilisées jusqu'à ce que des méthodes alternatives soient validées.»

Le choix des tests de toxicité devrait tenter de répondre aux critères de l'ensemble des diverses agences de réglementation nationales afin de minimiser la nécessité de répéter les études pour un pays spécifique. Dans chacun des cas, le client doit vérifier avec la(les) agence(s) de réglementation afin de déterminer le(s) test(s) nécessaire(s).

Recalculer les données toxicologiques publiées précédemment devrait également être envisagé, afin de vérifier la précision des valeurs DE₅₀ (Dose efficace 50) et DL₅₀ ([Irvine, et al., 1992](#)).

Études de toxicité aiguë chez les poissons. Les tests de toxicité aiguë avec des poissons ont été principalement effectués dans un cadre de protection de l'environnement des effluents industriels et d'évaluation des risques indits par de nouveaux pesticides en agriculture et en foresterie. La question principale touche à la sécurité tandis que la pathologie associée à la toxicité n'éveille que peu d'intérêt.

Si aucune information n'est disponible quant à la toxicité potentielle du matériel à tester sur le poisson, une étude de détermination des doses minimales et maximales devrait être faite avec un nombre minimal de poissons. À l'apparition de signes cliniques suraigus d'irritation ou de toxicité, le poisson devrait être

immédiatement retiré et transféré dans de l'eau propre. Si aucune réduction substantielle des signes cliniques n'apparaît dans les cinq minutes qui suivent le transfert en eau propre, le poisson devrait être euthanasié.

Ce n'est que lorsqu'une concentration des échantillons à tester ne provoquant pas de signes cliniques suraigus a été identifiée, qu'un nombre plus important de poissons pourra être exposé à cette dose et à des concentrations plus faibles qui seront utilisées pour déterminer la toxicité aiguë. Le nombre minimal de dilutions avec un nombre minimal de répétitions et un nombre minimal d'animaux utilisés par dilution, compatibles avec l'intervalle de confiance et le degré de précision exigés, devraient être utilisés.

Dans le cas d'un contrôle d'effluents qui dépasseraient de loin les limites de sécurité demandées, les tests devraient s'inscrire dans une approche offrant des résultats acceptables ou non-acceptables plutôt que de quantifier la dilution qui donne un point limite spécifié (ex.: CL₅₀ - Concentration létale 50%).

Pendant la période initiale d'exposition, les poissons devraient être observés de façon continue durant les 45 à 60 premières minutes. Les observations subséquentes devraient être faites selon une progression géométrique (ex.: 1,5 h; 3 h; 6 h et 12 h) puis au minimum deux fois par jour tant que dure l'étude. La fréquence des observations devrait augmenter avec l'apparition de signes cliniques quels qu'ils soient. Dès l'apparition de signes cliniques graves incompatibles avec la survie du poisson (ex.: bouche bée, violentes collisions avec le côté du bassin ou de l'aquarium, hyperactivité), celui-ci devrait être enlevé et transféré en eau propre. Si les signes cliniques persistent sans interruption pendant plus de cinq minutes ou sont suivis par la disparition de l'attitude normale ou de la position normale dans la colonne d'eau en eau propre, le poisson devrait être euthanasié.

Surveillance du Comité de protection des animaux dans le cas d'études de toxicité aiguë pour lesquelles la mort est le point limite. En plus des points déjà soulevés, certains principes supplémentaires devant aider les CPA institutionnels à remplir leurs obligations lorsque la mort comme point limite fait partie d'un protocole, ont été énumérés par [Hamm \(1995\)](#). Tel que déjà mentionné, une justification écrite du fait que la mort soit nécessairement le point limite doit être fournie au CPA avant que l'étude ne commence. Devraient figurer dans la documentation: l'assurance que des points limites plus précoces aient été envisagés plus tôt ainsi que les raisons pour lesquelles il ne peut y avoir d'analgésie. L'information sur la fréquence des contrôles par du personnel formé, l'identification des signes de détresse ou de maladie et le traitement des animaux présentant des anomalies devraient être fournis au CPA et faire partie des conditions préalables à l'expérience. Les registres complets documentant tous les actes et toutes les observations effectués devraient être classés et gardés à la disposition du CPA et du vétérinaire local ([Hamm, 1995](#)).

ii. **Études de toxicité chronique et études du vieillissement**

Principe directeur: Avant qu'un protocole impliquant la nécessité de maintenir des animaux à un âge près ou au-delà de l'âge de survie médian spécifique de l'espèce ou de la souche (ex.: études de toxicité chronique ou tests de

carcinogénicité, ou études du vieillissement) ne soit approuvé par le comité de protection des animaux de l'institution, le chercheur, en collaboration avec le personnel vétérinaire, doit établir quels sont les critères de point limite pour l'euthanasie des animaux, les personnes responsables de la surveillance de l'état des animaux et le pouvoir des personnes qui prendront la décision d'euthanasier l'animal.

En ce qui a trait aux points limites, l'un des domaines les plus controversés est celui des études de vieillissement ou de toxicité chronique, particulièrement les études de carcinogénicité exigées dans le cas de demandes liées à des nouveaux médicaments (Présentation de drogues nouvelles (PDN)). Dans ces études, les animaux peuvent recevoir le composé à l'essai pendant des périodes pouvant aller jusqu'à deux ans par les voies d'administration qui seront utilisées chez les humains. La plupart du temps, celles-ci sont orales (par gavage ou mélange au régime alimentaire) mais d'autres voies peuvent être utilisées. Le conflit surgit lorsque les chercheurs s'inquiètent du taux de survie. Pour que l'étude soit jugée négative, la [Food and Drug Administration \(FDA\)](#) et la [Environmental Protection Agency \(EPA\)](#) demandent que le taux de survie soit au moins de 50 %. En collaboration avec le personnel vétérinaire, le chercheur peut établir un critère d'euthanasie des animaux. Celui-ci devrait être défini avant que ne commence l'étude et appliqué au cas par cas.

Les chercheurs devraient se familiariser avec les recommandations actuelles de l'ICH concernant les exigences liées aux tests spécifiques avant de rédiger leurs protocoles de recherche/tests.

Le logement et le soin des animaux qui vieillissent demandent une attention spéciale quant à leur confort et à leur bien-être. Les rats de plus de 18 mois, par exemple, tendent à être gros et à développer des problèmes liés au poids tels des lésions aux coussinets des pattes, de l'obésité et des tumeurs. L'utilisation de cages à fonds solide ainsi que d'une litière appropriée améliorera le niveau de confort des animaux. Les vieux animaux peuvent également avoir besoin d'une attention particulière quant à la manière dont la nourriture et l'eau leur sont présentées.

d. **Recherche sur la douleur**

Du fait qu'il est inhérent aux études sur la douleur menées chez les êtres humains et les animaux qu'une certaine douleur soit provoquée, de telles expériences engendrent des préoccupations éthiques particulières. Cette difficulté fut reconnue très tôt lorsque l'étude de la douleur fut distinguée en tant que discipline. Destinés à servir de guide, les principes suivants furent extraits des références citées dans la discussion qui s'ensuit sur ce chapitre.

Principes directeurs:

- les animaux ne devraient être exposés qu'à la douleur minimale nécessaire aux objectifs de l'expérience;
- la durée de l'expérience devrait être aussi courte que possible et le nombre d'animaux impliqués gardé au minimum;
- des stimuli au seuil de la douleur devraient être utilisés de préférence aux stimuli à des niveaux au-dessus du seuil;
- si des modèles de douleur aiguë ou des tests de douleur aiguë sont utilisés pour lesquels la réaction de l'animal ne met pas fin à sa douleur mais que

- celle-ci peut se prolonger au-delà du temps nécessaire pour l'obtention de résultats, il devrait être mis fin à la douleur aussi rapidement que possible;
- l'utilisation de tout test autre que des tests avec comportement d'évitement est fortement découragée;
 - aux modèles animaux souffrant de douleurs chroniques, une analgésie adéquate devrait être donnée en tout instant. Sur ce point, ne devrait faire exception que les cas justifiés par le chercheur auprès du comité institutionnel de protection des animaux, sur la preuve que les analgésiques interféreront avec les objectifs de la recherche.

Les lignes directrices de [l'International Association for the Study of Pain \(IASP\)](#), [*Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals*](#) (désolé, lien plus disponible) ([Zimmermann, 1983](#)), comportent sept points liés à la justification de l'expérience ainsi qu'à la sévérité potentielle et à la durée de la douleur induite chez l'animal d'expérimentation. Ces sept points sont les suivants:

1. «Il est essentiel que les expériences projetées sur la douleur chez des animaux conscients soient auparavant révisées par des scientifiques et des non-scientifiques. Les bénéfices potentiels de telles expériences en ce qui concerne notre compréhension des mécanismes de la douleur et de la thérapie de la douleur doivent être démontrés. Le chercheur devrait avoir conscience de la nécessité éthique de continuer à justifier ses recherches.
2. Autant que faire se peut, le chercheur devrait essayer le stimulus de la douleur sur lui-même; ce principe s'applique pour la plupart des stimuli non-invasifs induisant une douleur.
3. Afin de pouvoir évaluer les niveaux de douleur, le chercheur devrait faire une évaluation attentive des déviations du comportement de l'animal par rapport à la normale. Pour cela, les paramètres physiologiques et comportementaux devraient être mesurés. Le résultat de cette évaluation devrait être consigné dans le compte rendu.
4. Lors d'études de douleur chronique ou aiguë chez les animaux, des mesures devraient être prises afin de garantir de manière raisonnable que l'animal est exposé à la douleur minimale nécessaire à la réalisation du but de l'expérience.
5. Un animal souffrant présumément de manière chronique devrait être traité afin d'être soulagé de sa douleur ou devrait pouvoir s'auto-administrer des procédures ou agents analgésiques, en autant que cela n'interfère pas avec les buts de la recherche.
6. Les études de la douleur chez un animal paralysé par un agent de blocage neuromusculaire ne devraient pas être accomplies sans que ne soit faite une anesthésie générale ou une procédure chirurgicale adéquate qui élimine la sensibilité.
7. La durée de l'expérience doit être aussi courte que possible et le nombre d'animaux impliqués gardé à son minimum.»

Dans le cas des modèles animaux de douleur aiguë, un plan détaillé de l'expérience et une réalisation précise de celle-ci permettront d'obtenir des résultats avec les plus petits nombres d'animaux nécessaires. Un point limite

approprié doit être défini. Le type de test de douleur proposé aura une incidence sur

le choix du point limite.

Ainsi que précisé par les lignes directrices de l'IASP, il incombe au chercheur d'être parfaitement au fait du comportement des espèces animales utilisées et de documenter les changements physiologiques et comportementaux observés chez les animaux sujets aux stimuli provoquant une douleur. Cela est également important afin de pouvoir reconnaître des niveaux de douleur élevés s'ils se présentent. Certains des tests relatifs à la douleur aiguë ont souvent été effectués sur des êtres humains et ces expériences devraient servir de repère aux chercheurs en ce qui concerne la nature de la douleur produite.

De nombreux tests de douleur utilisent un seuil de douleur qui peut être repéré par le déclenchement d'un comportement d'évitement ou de retrait de l'animal. Si l'intensité du stimulus est au-dessus du seuil nécessaire à l'obtention d'une réponse, l'application du stimulus doit être faite avec une attention particulière. Autant que faire se peut, les stimuli utilisés devraient être au niveau du seuil de douleur plutôt qu'à des niveaux supérieurs à celui-ci. Franklin et Abbott (1989) soulignent que, dans bien des cas, les stimuli avec des niveaux supérieurs au seuil de douleur ne sont pas nécessaires.

Lors de certains de ces tests, les animaux peuvent mettre fin eux-mêmes aux stimuli inducteurs de douleur. Par exemple, dans le test de latence de rétraction de la queue et dans celui de la plaque chauffante, la première réponse de l'animal dénote le point limite et l'animal est alors soustrait au stimulus. Dans d'autres tests (ex.: les tests induisant un dommage aigu aux tissus dont le test convulsif et le test de réaction au formol) le stimulus de douleur dure vraisemblablement plus longtemps que la durée du test et les animaux ne peuvent s'y soustraire. Il serait préférable d'utiliser des tests d'évitement plutôt que des tests avec lesquels la douleur continue après l'obtention des résultats. Si les modèles de douleur aiguë ou des tests de douleur aiguë sont utilisés dans lesquels la douleur ne prend pas fin avec la réaction de l'animal, il doit être mis fin à la douleur aussi rapidement que possible. Cela peut vouloir signifier que les animaux doivent être euthanasiés de manière humanitaire dès la fin du test (ex.: test convulsif) ou que des analgésiques doivent leur être administrés.

Les modèles animaux de douleur chronique soulèvent des questions particulières étant donné que le coût en résultant, pour les animaux auxquels une douleur chronique est induite (arthrite induite par adjuvant chez le rat, par exemple), peut être très élevé. Il est bien connu que de tels états pathologiques chez les êtres humains sont souvent accompagnés de douleur grave et incessante ainsi que de détresse. À moins qu'une attention particulière ne soit portée aux modèles animaux utilisés dans une telle étude, la douleur et/ou la détresse pourraient facilement continuer au-delà de ce qui est nécessaire aux objectifs de la recherche. [Franklin et Abbott \(1989\)](#) suggèrent que la douleur découlant de l'arthrite induite par adjuvant chez le rat approche une intensité telle que, en se basant sur l'échelle proposée par [Morton et Griffiths \(1985\)](#), un soulagement (par analgésiques) devrait être apporté. Le chercheur principal, le vétérinaire de l'institution et le CPA devraient s'assurer que toutes les options ont été considérées afin de limiter ou de diminuer l'inconfort et la douleur de ces animaux.

Tous les animaux souffrant de manière chronique devraient être suivis avec une attention particulière non seulement pour soulager leur souffrance mais également en ce qui a trait à leur gestion et leur hébergement. En plus des soins habituels

donnés aux animaux de laboratoire, beaucoup peut être fait pour améliorer le confort de ces modèles animaux particuliers (ex.: manipulation délicate, accès facilité à l'eau et à la nourriture, logement dans des cages à fond solide avec une couche épaisse de litière moelleuse). L'expertise du vétérinaire d'animaux de laboratoire et des techniciens en santé animale devrait être utilisée lors des discussions de ces éléments par le CPA.

e. **Études des maladies infectieuses, essais cliniques de vaccins, etc.**

Principe directeur: En ce qui a trait à toute recherche sur les maladies infectieuses, y compris les tests de virulence utilisant des modèles animaux, des points limites devraient être établis afin de minimiser le potentiel de souffrance et/ou de détresse chez les animaux.

Certaines études faites sur les maladies infectieuses (ex.: tests faits afin d'établir la virulence d'un organisme infectieux) sont encore effectuées avec la mort comme point limite proposé (aussi connues sous le nom de Test de protection des rongeurs). L'utilisation de tests DP₅₀ (dose protectrice 50 %) chez les souris peut s'avérer nécessaire lorsque des études anti-infectieuses sont faites.

[Soothill, et al. \(1992\)](#) ont trouvé que chez les souris infectées par des bactéries, une hypothermie de 34 °C s'avérait prédictive de mortalité. [Siems et Allen \(1989\)](#) ont recommandé que le point limite dans un modèle de maladie (infection chronique systémique par *Candida albicans*) soit défini (parmi d'autres mesures) comme étant le point auquel les animaux perdent plus de 20 % de leur poids ou lorsque leur température corporelle baisse de plus de 4 °C, ces deux symptômes pouvant être facilement surveillés. La grandeur de ces déviations par rapport à la normale donnerait une valeur maximale sur l'échelle de [Morton et Griffiths \(1985\)](#), indiquant des effets négatifs graves sur l'animal.

Le Rodent Protection Test Working Party de G.-B. a considéré que les signes suivants faisaient partie des signes généraux dont témoignent les rongeurs atteints d'infections systémiques: poil ébouriffé (ou hérissé), perte de poids, écoulement des yeux, léthargie, dos courbé, ataxie, tremblement, hypothermie, cyanose ([Acred, et al., 1994](#)). Des systèmes utiles d'évaluation clinique pour certains tests de protection des rongeurs (TPR) bactériens, dont les TPR pour *Candida albicans* et pour *Herpes simplex* furent recommandés par le Rodent Protection Test Working Party ([Acred, et al., 1994](#)).

L'utilisation de listes de vérification des observations avec des périodes d'observation suffisamment fréquentes (voir section 5 - Détermination de la fréquence nécessaire aux observations animales) aidera le chercheur à détecter le point auquel les signes d'une détérioration progressive de l'état de l'animal amèneraient celui-ci à mourir si aucune intervention n'est faite ([Acred, et al., 1994](#)).

f. **Modèles animaux spécifiques potentiellement associés à des niveaux significatifs de souffrance et/ou de détresse**

Principe directeur: Toute souffrance et/ou détresse ou déficience fonctionnelle affectant négativement le bien-être de l'animal, qui n'est pas «nécessaire» pour

l'étude sur le plan scientifique, devrait être soulagée ou minimisée. Les coûts ou les considérations pratiques ne devraient pas servir d'empêchement au dit soulagement. De plus, dès que l'étude est terminée, la souffrance et/ou la détresse devrai(en)t être soulagée(s) grâce à un traitement ou à l'euthanasie.

Certains modèles animaux comportent des déficiences fonctionnelles inhérentes ou induites potentiellement accompagnées de souffrance et/ou de détresse. S'occuper des besoins particuliers de ces animaux devient alors une responsabilité en plus d'assurer les soins normalement fournis aux animaux. Des modèles animaux avec anomalies héréditaires (phénotypes affectés ("distressed phenotypes")), des animaux transgéniques, des modèles d'ischémie ou de crises cérébrales et des manipulations stéréotaxiques d'animaux représentent certains des types d'animaux de laboratoire visés par cette recommandation.

10. RÉSUMÉ

Toute personne impliquée au niveau de l'utilisation des animaux à des fins de recherche, d'enseignement et de tests, nommément, les membres du CPA, les chercheurs et leur personnel de recherche, le vétérinaire des animaux de laboratoire et les techniciens en santé animale, a des responsabilités quant au soin et à l'utilisation humanitaire des animaux d'expérimentation. En travaillant conjointement avec les chercheurs pour l'établissement de points limites appropriés, le CPA devrait veiller à ce que les critères appropriés soient utilisés par le chercheur principal dans la détermination du point limite. Grâce à l'utilisation de listes de vérification des observations et de systèmes d'évaluation quantitative de l'état de l'animal, les points limites les plus objectifs et les plus humanitaires peuvent être identifiés. Les responsabilités relatives à l'observation et à la surveillance de l'état de l'animal doivent être clairement définies. Les personnes impliquées dans l'établissement et la validation des points limites sont encouragées à présenter et à publier leurs données afin de soutenir les efforts continus du raffinement des pratiques recourant à l'utilisation d'animaux en recherche biomédicale.

11. RÉFÉRENCES

ACRED, P., HENNESSEY, T.D., MACARTHUR-CLARK, J.A., *et al.* (1994). Guidelines for the welfare of animals in rodent protection tests - A Report of the Rodent Protection Test Working Party. *Laboratory Animals*, **28**(1):13-18.

ASSOCIATION CANADIENNE POUR LA MÉDECINE DES ANIMAUX DE LABORATOIRE (1990). Déclaration sur les soins vétérinaires adéquats.

BARCLAY, R.J., HERBERT, W.J. ET POOLE, T.B., eds. (1988). The disturbance index: a behavioural method of assessing the severity of common laboratory procedures on rodents. UFAW Animal Welfare Research Report No. 2. Herts UK: University. 35 pp.

BAUMANS, V., BRAIN, P.F., BRUGERE, H., *et al.* (1994). Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. Report of the FELASA Working Group on Pain and Distress. *Laboratory Animals*, **28**:97-112.

BRITISH VETERINARY ASSOCIATION (1985). Proceedings of a symposium: The Detection and Relief of Pain in Animals. 101 pp. London UK: BVA Animal Welfare Foundation.

BROWDER, E.J. (1995). Death as an Endpoint. In: *Proceedings - Current Issues and New Frontiers in Animal Research*. SCAW Conference (eds. K. Bayne, M. Greene & E. Prentice). San Antonio US: Scientists Center for Animal Welfare.

- BUTLER, S.H., WEIL-FUGAZZA, J., GODEFROY, F., *et al.* (1985). Reduction of arthritis and pain behaviour following chronic administration of amitriptyline or imipramine in rats with adjuvant-induced arthritis. *Pain* **23**: 159-175.
- CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX. (1989). [Principes régissant la recherche sur les animaux](#). Ottawa (ON): CCPA.
- CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX. (1991). Lignes directrices du CCPA sur [les techniques d'immunisation approuvées](#). Ottawa (ON): CCPA.
- CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX. (1993). [Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation, Vol. 1, 2^e éd.](#) 232 p. Ottawa (ON): CCPA.
- DE CASTRO COSTA, M., DE SUTTER, P., GYBELS, J., *et al.* (1981). Adjuvant-induced arthritis in rats: a possible model of chronic pain. *Pain* **10**: 173-185.
- EVERITT, J. ET GRIFFIN, W. (1995). Proposed IACUC Guidelines for the Review of Rodent Toxicology Studies. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* **34**(3): 72-74.
- FLECKNELL, P.A. (1994). Refinement of animal use - assessment and alleviation of pain and distress. *Laboratory Animals* **28**(3): 222-231.
- FRANKLIN, K.B.J. ET ABBOTT, F.V. (1989). Techniques for assessing the effects of drugs on nociceptive responses. In: *Neuromethods 13 - Psychopharmacology* (eds. A.A. Boulton, G.B. Baker & A.J. Greenshaw). pp. 145-216. Clifton NJ. US: Humana Press.
- GILLETTE, R.W. (1987). Alternatives to pristane priming for ascitic fluid and monoclonal antibody production. *Journal of Immunological Methods* **99**: 21-23.
- HAMM, T.E. (1995). Proposed institutional animal care and use committee guidelines for death as an endpoint in rodent studies. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* **34**(3): 69-71.
- INTERAGENCY RESEARCH ANIMAL COMMITTEE (1993). IRAC Recommendation on LD₅₀ Testing. *ILAR News* **35**(3-4): 56-58.
- IRVINE, D.G., REID, K.W., HANCOCK, D.S., *et al.* (1992). Quality assessment of external data: a further means of reducing animal use for toxicity testing - a case study. *Quality Assurance: Good Practice, Regulation and Law* **1**(3): 207-212.
- KEEFE, F.J., FILLINGIM, R.B. ET WILLIAMS, D.A. (1991). Behavioral assessment of pain: Nonverbal measures in animals and humans. *ILAR News* **33**(1-2): 3-13.
- MARX, U., EMBLETON, M.J., FISCHER, R., *et al.* (1997). Monoclonal Antibody Production - The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 23. *ATLA* **25**(2): 121-137.
- MCGUILL, M.W. ET ROWAN, A.N. (1989). Refinement of monoclonal antibody production and animal well-being. *ILAR News* **31**(1): 7-11.
- MONTGOMERY, C.A. Jr. (1987). Control of animal pain and distress in cancer and toxicological research. *JAVMA* **191**(10): 1277-1281.
- MONTGOMERY, C.A. Jr. (1990). Oncological and toxicological research: Alleviation and control of pain and distress in laboratory animals. *Cancer Bulletin* **42**(4): 230-237.
- MORTON, D.B. (1990). Adverse effects in animals and their relevance to refining scientific procedures. *ATLA* **18**: 29-39.
- MORTON, D.B. (1997). Ethical and refinement aspects of animal experimentation. Socio-economic and ethical aspects. In: *Veterinary Vaccinology* (eds. P.-P. Pastoret, J. Blancou, P. Vannier & C. Verschuereen). pp. 763-785. New York: Elsevier Science.

- MORTON, D.B. ET GRIFFITHS, P.H.M. (1985). Guidelines on the recognition of pain and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Veterinary Record* **116**:431-436.
- MORTON, D.B. ET TOWNSEND, P. (1995). Dealing with Adverse Effects and Suffering During Animal Research. In: *Laboratory Animals - An Introduction for Experimenters*, 2nd Edn. (ed. A.A. Tuffery). pp. 215-231. UK: Wiley & Sons Ltd.
- MUELLER, V.W., HAWES, C.S. ET JONES, W.R. (1986). Monoclonal antibody production by hybridoma growth in Freund's Adjuvant primed mice. *Journal of Immunological Methods* **87**:193-196.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1992). Recognition and assessment of pain, stress and distress. In: *Recognition and Alleviation of Pain and Distress in Laboratory Animals*. Chapter 4, pp. 32-53. ILAR, NRC. Washington DC: National Academy Press.
- OLFERT, E.D. (1995). Defining an acceptable endpoint in invasive experiments. *Animal Welfare Information Center Newsletter* **6**(1):3-7.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (1987). Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. Paris, France: OECD.
- REDGATE, E.S., DEUTSCH, M. ET BOGGS, S.S. (1991). Time of death of CNS tumor-bearing rats can be reliably predicted by body weight-loss patterns. *Laboratory Animal Science* **41**(3):269-273.
- RUSSELL, W.M.S. ET BURCH, R.L. (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen. 238 pp. Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), Potters Bar, Herts, UK: England. Special edition (1992).
- SANFORD, J., EWBANK, R., MOLONY, V., *et al.* (1986). Guidelines for the recognition and assessment of pain in animals. *Veterinary Record* **118**(12):334-338.
- SHALEV, M. (1998). European and US regulation of monoclonal antibodies. *Lab Animal* **27**(2):15-17.
- SIEMS, J.J. ET ALLEN, S.D. (1989). Early euthanasia as an alternative to death in chronic infectious disease studies using a systemic *Candida albicans* model. Abstr. 89th Annual Meeting of the American Society for Microbiology.
- SMITH, C.P., JENSEN, D., ALLEN, T., *et al.* (1997). Information resources for adjuvants and antibody production: comparisons and alternative technologies - 1990-1997. AWIC Resources Series #3. Animal Welfare Resources Center, USDA.
- SOMA, L.R. (1987). Assessment of animal pain in experimental animals. *Laboratory Animal Science* **37**:71-74.
- SOOTHILL, J.S., MORTON, D.B. ET AHMAD, A. (1992). The HID₅₀ (Hypothermia Inducing Dose 50): an alternative to the LD₅₀ for the measurement of bacterial virulence. *International Journal of Experimental Pathology* **75**:95-98.
- TOMASOVIC, S.P., COGHLAN, L.G., GRAY, K.N., *et al.* (1988). IACUC evaluation of experiments requiring death as an endpoint: a cancer center's recommendations. *Laboratory Animals* **17**:31-34.
- TOTH, L.A. (1997). The moribund state as an experimental endpoint. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* **36**(3):44-48.
- TOWNSEND, P. ET MORTON, D.B. (1994). Practical assessment of adverse effects and its use in determining humane endpoints. In: *Proceedings of the Fifth FELASA Symposium: Welfare and Science*, June 1993 (ed. J. Bunyan). pp. 19-23. Brighton, UK: FELASA.
- WALLACE, J., SANFORD, J., SMITH, M.W., *et al.* (1990). The assessment and control of the severity of scientific procedures on laboratory animals. *Laboratory Animals* **24**(2):97-130.

WOLFENSOHN, S. ET LLOYD, M. (1994). Recognition of pain and stress in laboratory animals. In: *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. Chapter 11. pp. 174-180. Oxford, UK: Oxford University Press.

WONG, J.P., SARAVOLAC, E.G., CLEMENT, J.G., *et al.* (1997). Development of a murine hypothermia model for study of respiratory tract influenza virus infection. *Laboratory Animal Science* **47**(2):143-147.

WORKMAN, P., TWENTYMAN, P., BALKWILL, F., *et al.* (1998). United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia (Second Edition, July 1997). *British Journal of Cancer* **77**:1-10.

ZIMMERMANN, M. (1983). Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. *Pain* **16**:109-110.

ANNEXE A: SIGNES SPÉCIFIQUES DE SOUFFRANCE ET/OU DE DÉTRESSE SELON LES ESPÈCES

1. COMPRENDRE LE COMPORTEMENT NORMAL DE L'ANIMAL

Se familiariser avec l'apparence, le comportement et la physiologie de l'animal normal est d'une importance primordiale pour l'évaluation de son bien-être. Il est également important d'être attentif aux changements d'apparence, de comportement et de physiologie en fonction de l'âge, de la souche, du sexe et du moment de la journée. Certaines espèces peuvent également présenter des différences saisonnières.

En plus des types de comportements normaux de l'animal pris séparément (posture, toilettage, alimentation, sommeil, élimination d'urine et des fèces, etc.), ses interactions avec ses compagnons de cage, et ses réactions à son environnement devraient être notées. La réponse normale de l'animal à la manipulation et à l'examen doit être incluse dans le comportement normal de l'animal.

La plupart des animaux de laboratoire normaux et en bonne santé possèdent du poil lisse, propre et d'apparence bien soignée. Un manque de soin au niveau du toilettage est d'ordinaire un indicateur fiable de dysfonction. L'état du corps peut être évalué en observant la forme et la posture des animaux.

Les animaux normaux mangent, boivent et éliminent des déchets quotidiennement. Une compréhension de la consommation normale de nourriture et d'eau ainsi que de la nature et de la quantité d'urine et de fèces produites quotidiennement forment une part importante de la connaissance d'un animal en bonne santé. Le comportement des animaux lorsqu'ils mangent ou boivent devrait être également noté.

En général, la plupart des petits mammifères de laboratoire en bonne santé sont actifs, alertes et curieux lorsqu'ils sont approchés. Normalement, tout dérangement des animaux devrait provoquer une réponse. Les animaux devraient être assez chauds au toucher lorsqu'ils sont manipulés.

Pour un examen physique plus détaillé, les lapins et petits rongeurs devront être manipulés et mis sous contention. La réaction normale de ces animaux à la manipulation devrait être connue de façon à ce que les réactions inhabituelles ou anormales soient notées.

2. RECONNAÎTRE ET ÉVALUER LES SIGNES DE SOUFFRANCE ET/OU DE DÉTRESSE CHEZ LES ANIMAUX DE LABORATOIRE

L'un des principaux problèmes d'identification des signes de souffrance et/ou de détresse chez les rongeurs de laboratoire est la petite taille de ces animaux. Certaines des observations cliniques faites sur de plus grands animaux afin d'évaluer leur santé et leur bien-être (ex.: température, pouls et respiration) ne sont pas faciles à faire chez les rongeurs de laboratoire. Il devient donc d'autant plus important d'évaluer le comportement de ces animaux pour noter tout comportement différent de la normale qui peut s'avérer être un signe de souffrance ou d'inconfort. Dans ce cadre, il est nécessaire d'évaluer autant l'animal pris séparément que le

comportement de celui-ci en groupe.

Les réponses comportementales et physiologiques à la souffrance et/ou à la détresse chez les animaux varient énormément selon les espèces tandis que dans une même espèce existent des différences individuelles, et d'autres liées au sexe et à l'âge. Les signes suggérant une souffrance aiguë et ceux qui suggèrent une souffrance chronique devraient être compris de toutes les personnes responsables de la surveillance des animaux pendant la recherche. Les signes de souffrance ou de détresse chronique sont souvent plus insidieux et une observation plus attentive est nécessaire afin de détecter les changements dans l'apparence et le comportement de l'animal. L'observation des animaux devrait être faite fréquemment étant donné que les signes de souffrance et d'inconfort ne sont pas continuellement présents.

Selon le(s) système(s) d'organes affectés, il existe des signes comportementaux et physiologiques qui peuvent être utilisés afin d'évaluer l'état de l'animal. Par exemple, si le système respiratoire est affecté, la vitesse et la nature de la respiration seront modifiées. Des changements dans la nature et la quantité de fèces (ex.: diarrhée) peuvent indiquer un effet sur le plan intestinal. Pour une liste détaillée des signes potentiels de maladie, de souffrance et/ou de détresse en rapport aux systèmes affectés du corps, le lecteur est prié de se reporter aux références citées ci-après. La présence ou l'absence de ces signes spécifiques devrait être notée.

3. RÉFÉRENCES EN CE QUI CONCERNE LES SIGNES DE SOUFFRANCE ET/OU DE DÉTRESSE CHEZ LES ANIMAUX D'EXPÉRIMENTATION

Le [*Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation, Vol. 1, 2^e éd., 1993*](#), du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) comporte plusieurs sections qui donnent de l'information sur le comportement normal des animaux utilisés en recherche biomédicale, en enseignement et dans les tests ainsi que sur les signes de souffrance et/ou de détresse de ces espèces. Le lecteur est prié de se reporter aux sections suivantes: particulièrement au Chapitre X - Contrôle de la douleur chez les animaux utilisés en recherche, en enseignement et dans les tests, Section E, p. 133 à 138, ainsi qu'à certaines parties du Chapitre VI - Besoins sociaux et comportementaux des animaux d'expérimentation.

Parmi d'autres publications comportant des sections sur les signes de souffrance et/ou de détresse chez un certain nombre d'espèces animales utilisées en recherche biomédicale, en enseignement et dans les tests, figurent [*](#) :

BAUMANS, V., BRAIN, P.F., BRUGERE, H., *et al.* (1994). Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. Report of the FELASA Working Group on Pain and Distress. *Laboratory Animals* **28**(1):97-112.

FLECKNELL, P.A. (1994). Refinement of animal use - assessment and alleviation of pain and distress. *Laboratory Animals* **28**(3):222-231.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1992). Recognition and assessment of pain, stress and distress. In: *Recognition and Alleviation of Pain and Distress in Laboratory Animals*. Chapter 4, pp. 32-53. ILAR, NRC. National Academy Press, Washington DC.

SANFORD, J., EWBank, R., MOLONY, V., *et al.* (1986). Guidelines for the recognition and assessment of pain in animals. *Veterinary Record* **118**(12): 334-338.

WALLACE, J., SANFORD, J., SMITH, M.W., *et al.* (1990). The assessment and control of the severity of scientific procedures on laboratory animals. *Laboratory Animals* **24**(2): 97-130.

WOLFENSOHN, S. ET LLOYD, M. (1994). Recognition of pain and stress in laboratory animals. In: *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. Chapter 11. pp. 174-180. Oxford UK: Oxford University Press.

* Cette liste sera régulièrement mise à jour.

ANNEXE B: SIGNES DE SOUFFRANCE ET/OU DE DÉTRESSE LORS D'ÉTUDES DE TOXICOLOGIE AVEC DES POISSONS

1. OBSERVATION DU COMPORTEMENT DES POISSONS

Les points suivants sont importants pour s'assurer que l'observation des poissons s'effectue sans omettre d'observations importantes, sans modifier par inadvertance leur comportement normal et sans biaiser les résultats.

a. Éclairage

De nombreuses espèces de poissons «préfèrent» un éclairage de faible intensité, un fond sombre ou les deux afin de se sentir en sécurité (ainsi que l'indique la diminution de ce qui pourrait être qualifié de comportement anxieux ou nerveux). Il est important que le chercheur établisse un compromis acceptable entre un éclairage adéquat et une combinaison de couleurs de fonds qui permettront au personnel de recherche d'effectuer des observations fiables en ne provoquant qu'une détresse minimale chez l'animal testé. Un arrangement permettant d'habitude d'obtenir de bons résultats combine un éclairage protégé, situé directement au-dessus du réservoir ou de l'aquarium, avec un éclairage de la pièce d'intensité lumineuse nulle ou faible. Ceci permet d'atteindre deux objectifs que sont l'accommodation de l'œil de l'observateur à une faible lumière et, pour le poisson, une visibilité réduite de l'observateur. Dans le cas où les parois du réservoir sont partiellement ou totalement transparentes, il faut tenir compte de la différence des intensités lumineuses entre l'intérieur du réservoir (forte) et son extérieur (faible) car si celle-ci est suffisamment grande, les parois du réservoir feront miroir en auquel cas les types de poissons, dont le comportement territorial est fort, répondront comme s'ils devaient défendre leur territoire et pourraient ne pas s'alimenter normalement. Le chercheur doit également se souvenir que la capacité de faire des observations détaillées à faible intensité lumineuse est affectée par l'âge de l'observateur et certains médicaments.

b. Confort de l'observateur

L'environnement d'observation devrait offrir un confort suffisant au personnel de recherche de façon à ce qu'il puisse effectuer sa recherche sans introduire de biais (en d'autres mots, il ne doit pas être plus facile d'observer une unité expérimentale qu'une autre).

c. Plans d'observation des poissons

L'unité de logement du poisson (ex.: le réservoir ou l'aquarium) doit convenir aux espèces et aux observations requises. Si un changement de position du poisson dans la colonne d'eau est un signe clinique anticipé (en particulier une position adoptée avec la tête ou la nageoire caudale vers le bas), il est important de pouvoir avoir une vue latérale des poissons puisqu'un changement de position beaucoup plus prononcé est nécessaire avant qu'il puisse être repéré à partir du dessus du réservoir. Pour documenter des signes cliniques tels que le rythme respiratoire et l'amplitude des mouvements respiratoires, il est souvent plus facile de faire des observations en se plaçant dans le plan vertical du poisson (soit directement au-dessus ou

au-dessous du poisson) pour l'observation des mouvements des opercules, ou dans les plans horizontal-latéral ou horizontal-frontal du poisson pour ceux des opercules et de la bouche.

d. **Vêtements de l'observateur**

Les observateurs devraient éviter de porter des vêtements blancs ou clairs (ex.: sarraus de laboratoire), nombreuses étant les espèces de poissons utilisées en recherche qui sont assez «sauvages» ou non domestiquées et pour lesquelles le blanc demeure un signe de danger.

2. **OBSERVATIONS CLINIQUES PARTICULIÈRES AUX POISSONS**

Les cinq aspects de l'état de l'animal qui devraient être observés pour l'évaluation de la souffrance, de la détresse et de l'inconfort (Morton et Griffiths, 1985) s'appliquent également aux espèces aquatiques en tenant compte de certaines particularités liées à l'importance des variations de poids comme indicateurs de souffrance et/ou de détresse.

- a. Chez les animaux de laboratoire plus traditionnels, la perte anormale ou non-prévue de poids est le paramètre habituellement sous surveillance. Chez les espèces aquatiques endothermiques, particulièrement lorsqu'elles sont gardées dans une eau dont la température est au niveau ou au-dessous de la gamme de températures spécifiques à l'espèce, la perte de poids est extrêmement lente. Un gain de poids plus lent que la normale peut indiquer plus sûrement un environnement ou une santé qui soit au-dessous des normes optimales.
- b. Certaines espèces de poissons témoignent d'anorexie physiologique normale en réponse aux variations environnementales, à la maturation sexuelle ou à ces deux éléments réunis. Un manque d'attention aux critères environnementaux peut précipiter une anorexie physiologique normale.
- c. L'expérience tend à montrer qu'environ 6 à 7 % des saumons de l'Atlantique gardés dans un réservoir d'eau de mer ne mangeront pas. Néanmoins, lorsqu'ils sont déplacés dans un autre réservoir, en particulier si ce sont de plus gros poissons dans une nouvelle situation, ils commenceront à s'alimenter normalement.
- d. Un changement dans le comportement alimentaire ou au niveau de la consommation de nourriture dans l'unité expérimentale (le réservoir) est un indicateur plus sensible et plus immédiat d'anormalités environnementales ou de santé que des variations du poids corporel.

3. **QUELQUES OBSERVATIONS SUGGÉRÉES POUR QUANTIFIER LA SOUFFRANCE ET/OU LA DÉTRESSE CHEZ LES POISSONS**

- **Comportement alimentaire/Consommation de nourriture**
(a normale dépend de la température de l'eau, de la taille du poisson et de la palatabilité du type de nourriture pour les poissons)

- **Apparence physique**
 - normale
 - état des nageoires et de la peau
 - sécrétion de mucus
 - changement de couleur (généralement une couleur plus foncée témoignant d'une maladie ou d'une double cécité)

- **Signes cliniques mesurables**

(la normale dépend de la température environnementale à laquelle le poisson a été acclimaté ainsi que de la taille du poisson)

 - consommation de nourriture
 - rythme respiratoire
 - position dans la colonne d'eau

- **Comportement non provoqué**
 - position dans la colonne d'eau
 - interactions sociales
 - hyperactivité
 - hypoactivité

- **Comportement provoqué**
 - activité alimentaire
 - réaction d'évitement face à une poussée
 - réaction d'évitement face à un rayon lumineux

ANNEXE C: EXEMPLES DE LISTES DE VÉRIFICATION RELATIVES AUX OBSERVATIONS UTILISÉES POUR DÉTERMINER LES POINTS LIMITES

Note: Les listes de vérification des observations présentées ci-dessous ne sont citées qu'à titre d'exemple. Pour chacune des expériences pour lesquelles des points limites sont nécessaires, le chercheur principal en consultation avec le vétérinaire en service et le comité de protection des animaux devraient développer leur propre liste de vérification particulière à leur programme de recherche.

1. EXEMPLE N° 1 DE LISTE DE VÉRIFICATION - MALADIE RESPIRATOIRE INFECTIEUSE AIGUË CHEZ LES BOVINS - ÉTUDE DE VACCIN/D'ESSAI INFECTIEUX

a. Évaluation clinique

Chaque matin (8 h - 12 h) du jour 0 au jour 10, le vétérinaire de l'équipe de recherche fera passer un examen clinique aux veaux. Durant l'après-midi, ils seront examinés dans leur enclos par un technicien en santé animale. Les veaux, auxquels une valeur témoignant du degré de la maladie supérieure à 3.0 aura été assignée par le vétérinaire de l'équipe de recherche, seront euthanasiés le même jour et une nécropsie sera immédiatement effectuée.

Pendant la période de vaccination et d'évaluation de l'étude, aucun médicament ne sera administré sauf dans le cas fortuit d'une réaction de type anaphylactique à la vaccination. L'administration d'agents antimicrobiens pendant l'étude annulerait la valeur de l'essai étant donné que l'efficacité du vaccin est évaluée à partir des paramètres que sont la maladie, le changement de poids, la mort et la gravité des lésions post-mortem.

b. Variables liées aux réponses et méthode d'évaluation quantitative

L'examen clinique de chacun des veaux sera fait quotidiennement (du jour 0 au jour 10) par le vétérinaire de l'équipe de recherche, à l'aide des paramètres standardisés suivants afin de juger du degré de maladie clinique. Les valeurs sont décrites sur une échelle de 0 à 4.

- i. **Poids.** Le poids de l'animal est noté quotidiennement. Dépendant du moment auquel l'animal a mangé, des fluctuations de poids peuvent être notées. Une perte de poids soutenue pendant quelques jours consécutifs est généralement caractéristique d'animaux présentant d'autres signes cliniques.
- ii. **Température.** La température rectale de l'animal est prise en l'immobilisant dans un couloir incliné. Les températures seront prises et notées quotidiennement pour tous les animaux. Les températures de chacun des animaux ainsi que les températures moyennes de chaque groupe seront évaluées. Des précautions doivent être prises dans le processus d'évaluation étant donné que les animaux gravement atteints, proches de la mort, ont généralement des températures au-dessous des températures normales qui abaisseront artificiellement les températures moyennes des groupes. Dans de tels cas, si un animal a une température élevée suivie d'une température qui baisse le jour de sa mort ou le jour qui précède, ces dernières peuvent être exclues du

calcul de la température quotidienne moyenne du groupe pour les jours concernés.

iii. **Rhinite ou valeur nasale.**

0	<i>Normale</i> (muqueuse rose pâle, aucun écoulement nasal visible).
1	<i>Rhinite légère</i> (rhinite séreuse légère avec nécrose localisée des muqueuses, naseaux humides, sécrétions transparentes, muqueuses avec hyperémie modérée, vésicules localisées sur la muqueuse, petites plaques circulaires blanches nécrotiques de moins de 2 mm de diamètre, léger écoulement nasal séreux).
2	<i>Rhinite modérée</i> (rhinite séreuse de sévérité moyenne avec régions confluentes de nécrose mucosale, mélange de plaques localisées et de régions confluentes de nécrose, naseaux non obstrués par des exsudats, muqueuses grandement hyperémiques, larges plaques muqueuses confluentes de plus de 2 mm de diamètre, écoulement nasal séreux avec globules occasionnels ou petites coulées d'exsudat mucopurulent).
3	<i>Rhinite sévère</i> (rhinite nécrosante, écoulement nasal obstruant partiellement les naseaux, des plaques nécrotiques couvrant de grandes parties de la muqueuse nasale, forte hyperémie des muqueuses, halitose possible, naseaux partiellement obstrués par des exsudats, sécrétions nasales composées d'un mélange d'exsudats mucopurulents et séreux, grandes plaques muqueuses confluentes, tissus nécrotiques formant des pseudomembranes diphtériques se détachant de la cloison nasale).
4	<i>Rhinite très sévère</i> (rhinite mucopurulente très sévère avec nécrose des muqueuses avancée, érosions des muqueuses saignant facilement, halitose, écoulement nasal abondant, exsudat sortant des naseaux, respiration par la bouche, cou tendu, couche épaisse d'exsudat purulent ou catarrheux sur les muqueuses nasales, exsudat obstruant presque entièrement les naseaux).

iv. **Valeur de dépression.**

0	<i>Normal</i> (animé, alerte, yeux brillants, oreilles dressées, rumine, curieux, attentif, reste en groupe, étire les muscles du dos et les pattes arrière lorsqu'il se lève, lèche fréquemment ses naseaux, normalement moins de dix secondes après avoir été dégagé de l'entrave).
1	<i>Légèrement déprimé</i> (oreilles légèrement affaissées, reste rarement seul, se lèche parfois les naseaux, essaie de rester avec le groupe, difficile à coincer ou presque impossible à attraper dans l'enclos).
2	<i>Modérément déprimé</i> (marche lentement, léthargique, s'isole pour des périodes prolongées, a parfois la tête basse, facile à coincer mais serait difficile à attraper).
3	<i>Sévèrement déprimé</i> (ne s'intéresse pas à son environnement, très léthargique, apathique, reste la plupart du temps debout tête baissée, à la traîne, fréquemment allongé en position sternale,

	souvent étendu, peu disposé à se lever mais le fait si encouragé, peut être facilement attrapé par une seule personne).
4	<i>Moribond</i> (presque mort, ne fait aucun effort pour nettoyer ses naseaux, pratiquement toujours étendu, se lève rarement, ne réagit pas à son milieu, sans volonté ou fort peu disposé à se lever, allongé en position sternale ou latérale).

v. **Force.**

0	<i>Normale</i> (en bonne santé, fort, posture solide, court vite, bonne coordination, impossible à attraper, s'étend avec la tête et les pattes en position normale repliées en dessous de lui, se déplace facilement avec le groupe).
1	<i>Faiblesse légère</i> (démarche instable, les sabots se retournent parfois lorsque l'animal marche, l'arrière train de l'animal vacille, mais l'animal ne trébuche pas, marche lentement mais peut trotter et galoper lorsque pourchassé).
2	<i>Faiblesse modérée</i> (vacille de façon marquée, peut tomber lorsqu'il se démène, mais se relève tout de suite, peut marcher et trotter, mais ne peut galoper, reste avec la tête posée sur le sol lorsqu'allongé, assez facile à déséquilibrer, pourrait être renversé sur le côté en ne forçant qu'un peu).
3	<i>Faiblesse sévère</i> (se lève avec difficulté, les articulations cèdent souvent, trébuche à l'occasion, court lentement, s'attrape facilement, se lève difficilement, très facile à déséquilibrer, tombe souvent lorsqu'il se démène).
4	<i>Détérioration avancée</i> (très faible, incapable de se tenir debout, décharné, déshydraté, yeux enfoncés, peau tendue).

vi. **Détresse respiratoire.**

0	<i>Normale</i> (respiration normale par les naseaux, bouche fermée, lèvres sèches).
1	<i>Détresse respiratoire faible</i> (respiration intermittente par la bouche, lèvres et mâchoires humide à cause de la salivation, mais la bouche ne reste pas ouverte, membranes muqueuses roses à moins que l'animal ne soit stressé).
2	<i>Détresse respiratoire modérée</i> (se tient avec le cou allongé, salive à profusion, museau complètement trempé).
3	<i>Détresse respiratoire sévère</i> (respire par la bouche lorsque stressé, ouvre la bouche fréquemment, sort la langue à l'occasion, respire par la bouche lorsque perturbé, difficultés respiratoires, cyanose associée avec un stress même minimal).
4	<i>Détresse respiratoire très sévère</i> (cyanose, tient la tête basse, cou allongé, bouche ouverte et langue pendante, bave beaucoup, expression anxieuse).

- vii. **Valeur pathologique.** Subjective - a pour fonction d'émuler la décision de choisir des animaux devant être traités à la ferme ou au parc d'engraissement. Cette valeur est attribuée après avoir inscrit les autres valeurs et après avoir informé le clinicien de la température de l'animal. Étant donné que les animaux ne sont pas traités avec des antibiotiques, ce système d'évaluation par attribution d'une valeur est utilisé afin de déterminer le point limite auquel un animal sera euthanasié plutôt que de le laisser mourir.

0	<i>Animal en bonne santé</i> (l'animal est normal et en santé, aucun traitement requis, pas de fièvre, pas de symptômes cliniques).
0,5	<i>Maladie soupçonnée</i> (l'animal ne serait pas traité, signes cliniques légers et aucune fièvre, température entre 39,5 °C et 39,9 °C et aucuns signes cliniques, un seul signe clinique chronique persistant et aucune fièvre, animal non déprimé et mangeant encore bien).
1	<i>Animal légèrement malade</i> (l'animal serait traité, fébrile (40 °C) et/ou signes cliniques, la maladie a progressé au point où le traitement commencerait à la ferme ou au parc d'engraissement, la guérison serait probable avec un traitement approprié).
2	<i>Animal clairement malade</i> (l'animal serait traité, signes cliniques évidents, d'habitude fébrile, la maladie est maintenant grave - l'animal aurait dû être traité avant que la maladie ne se développe à ce point, la guérison n'est pas certaine même suite à un traitement approprié). Ces animaux sont surveillés afin de voir s'ils s'approchent de la valeur pathologique suivante.
3	<i>Animal très malade</i> (l'animal serait traité dans un milieu clinique, signes cliniques sérieux, incluant dépression - il peut avoir de la fièvre ou une chute de température, la maladie est très grave, la guérison est peu probable même suite à un traitement approprié). Ces animaux sont euthanasiés.
4	<i>Moribond</i> (mourant, le traitement serait inutile; l'animal serait euthanasié dans un milieu clinique ou expérimental).

2. EXEMPLE N° 2 DE LISTE DE VÉRIFICATION - MALADIE INFECTIEUSE CHRONIQUE CHEZ LA SOURIS – LEISHMANIOSE

a. Généralités

- i. Les vétérinaires d'animaux de laboratoire doivent être avisés au début de chaque expérience supposant l'inoculation d'un coussinet plantaire - date de l'inoculation, nombre d'animaux impliqués, etc.
- ii. Tout effet négatif pour l'état de l'animal doit être noté sur une liste de vérification, par le personnel de recherche ou les techniciens d'animaux de laboratoire, et rapporté au vétérinaire d'animaux de laboratoire.
- iii. Les animaux sujets d'expériences doivent être pesés chaque semaine.
- iv. Les registres ayant trait aux observations des animaux et aux mesures des points limites seront gardés par le chercheur principal. Ces registres doivent être gardés

dans la pièce de l'animal, accessibles autant au personnel technique de soin des animaux qu'au vétérinaire.

- v. Tous les effets négatifs non prévus sur la santé et le bien-être des animaux doivent être immédiatement rapportés au vétérinaire d'animaux de laboratoire.

b. Variables liées aux réponses et système d'évaluation quantitative

i. Changement de poids corporel.

0	Normal
1	Perte de poids < 10 %
2	Perte de poids entre 10 et 15 %
3	Perte de poids > 20 %.

ii. Apparence physique.

0	Normale
1	Manque de toilettage
2	Poil ébouriffé, écoulement nasal/oculaire
3	Poil très ébouriffé, posture anormale.

iii. Comportement.

0	Normal
1	Changements mineurs: démarche boitante, protégeant la patte inoculée
2	Anormal; mobilité réduite, inactif
3	Vocalisations non sollicitées, auto-mutilation, très agité ou immobile.

- c. **Évaluation quantitative du point limite:** lorsqu'une valeur totale de trois ou plus est attribuée en suivant la liste de vérification ci-dessus, le vétérinaire d'animaux de laboratoire doit en être averti.

d. Particularités

- i. **Inoculation au niveau du coussinet plantaire.** L'inflammation au niveau du coussinet plantaire sera mesurée avec une pince à pli adipeux. Les mesures de l'inflammation au niveau du coussinet plantaire seront prises chaque semaine. Lorsque l'inflammation au niveau du coussinet plantaire sera de 4 mm, les animaux seront tués de manière humanitaire. Dans le cas où ce point limite est atteint et que le chercheur principal n'est pas disponible, la décision en ce qui a trait au devenir immédiat des animaux sera prise par le vétérinaire.

- ii. **Inoculation au niveau de la peau du postérieur.** Le diamètre de la lésion cutanée sera mesuré chaque semaine. Lorsque la lésion de la peau atteint 8 mm, les animaux seront tués de manière humanitaire. Dans le cas où ce point limite est atteint et que le chercheur principal n'est pas disponible, la décision en ce qui a trait au devenir immédiat des animaux sera prise par le vétérinaire.

3. EXEMPLE N° 3 DE LISTE DE VÉRIFICATION - CANCER DU COLON INDUIT CHIMIQUEMENT (AZOXYMÉTHANE) CHEZ LES RATS

Dans ce modèle, qui emploie des rats Sprague-Dawley, les tumeurs du colon se développent de six à huit mois après le début du protocole de carcinogénèse, et croissent relativement lentement ensuite. Les soins habituels aux animaux et la surveillance habituelle sont prodigués durant les quatre premiers mois. Quatre mois après le début, les animaux sont examinés trois fois par semaine pour détecter des signes de masse tumorale. Un animal est tué à ce moment-là afin d'évaluer la progression de la tumeur dans chaque expérience particulière. Les examens supposent que l'abdomen soit palpé pour détecter la présence de tumeurs ou de liquide ascitique, que les yeux soient examinés pour repérer des signes d'anémie, que les fèces soient testés pour détecter du sang, et que l'examen de l'apparence générale et du comportement de l'animal soit effectué.

a. Variables liées aux réponses et système d'évaluation quantitative

i. Changement de poids corporel.

0	Normal
1	Perte de poids < 10 %
2	Perte de poids entre 10 et 15 %
3	Perte de poids > 20 %.

ii. Apparence physique.

0	Normale
1	Anémie (couleur pâle des yeux)
2	Anémie, et sang dans les fèces, diarrhée et/ou petites boules de matières fécales
3	Les signes ci-dessus ainsi qu'un gonflement au niveau de l'abdomen
4	Poils ébouriffés, absence de toilettage, posture anormale.

Évaluation du point limite: Si la perte de poids excède 15 % comparaison faite avec les animaux témoins, et si les animaux ne sont pas euthanasiés immédiatement, des analgésiques leur seront alors administrés jusqu'à la fin de l'expérience. Tout animal auquel aura été attribuée une valeur totale égale à quatre ou plus en se rapportant à la liste de vérification ci-dessus, sera euthanasié et une nécropsie sera faite afin d'évaluer la masse tumorale et de prendre des échantillons de tissus.