

Chapitre 3 : Manipulation sur l'animale de laboratoire

1-Manipulations sur l'animal

1.1-La contention

La contention est la manière de soulever et de fixer un animal sans lui causer de souffrances inutiles. Elle permet de minimiser les mouvements de l'animal lors des manipulations, administration de substances, injections, prélèvements... etc.

Une contention erronée peut provoquer un stress à l'animal, réaction agressive (morsures, fuite...). Des appareils de contention existent, ils facilitent énormément ces manipulations.

Contention manuelle d'une souris pour administration par voie orale, injection intraperitoneal



Boite de contention pour souris avec accès à la queue. Cette boîte (Ø 32mm, longueur réglable) permet, en plus de la fixation de l'animal, de pratiquer des injections et prélèvement de sang à partir de la queue. La façade est perforée pour la respiration normale



Boite de contention pour souris. Perforée à plusieurs endroits et en plus de l'accès à la queue, elle permet de faire des prélèvements et injections dans différentes régions du corps.



2-Méthodes et voies d'administration

Plusieurs méthodes d'administration sont proposées afin de faciliter l'introduction des différentes substances tout en minimisant les douleurs et les souffrances qui peuvent accompagner ces manipulations. Il est important de signaler de vérifier l'état et la disponibilité du matériel nécessaire avant l'immobilisation de l'animal.

2.1- Administration Intranasale (IN)

Après la contention de l'animal, une seringue ou une pipette sont utilisées pour faire inhaler à l'animal la substance à administrer. Le geste peut être répété jusqu'à l'administration de la quantité totale désirée.

2.2- Intramusculaire (IM)

Une fois les animaux sont bien immobilisés et l'une des pattes arrière est libre et stabilisée, l'injection peut être faite, en utilisant une seringue.

L'aiguille doit être introduite perpendiculairement à la peau de l'animal. En utilisant une seringue de taille appropriée et une aiguille, l'injection se fait dans le quadriceps de l'animal (l'avant de la cuisse) ou du côté latérale de la cuisse. Il faut éviter d'injecter dans le côté postérieur de la cuisse car il est possible d'endommager le nerf sciatique.

On peut alterner les jambes si l'animal doit recevoir des injections intramusculaires multiples.



contention pour l'injection intra-musculaire



injection intramusculaire

2.3- Intrapéritonéale (IP)

L'animal est immobilisé selon une contention qui fixe la nuque et le dos de l'animal ce qui permet d'exposer l'abdomen pour l'injection.

On localise la ligne médiane de l'animal et on divise mentalement l'abdomen en quadrants. Les quadrants inférieurs et surtout le quadrant inférieur droit sont les sites appropriés pour les injections intra-péritonéales. Le quadrant inférieur droit est choisi en raison de l'absence de structures anatomiques importantes. IP se fait à l'aide d'une seringue de taille appropriée et d'une aiguille. On alterne les sites d'injection si l'animal doit recevoir des injections répétées.



injection intramusculaire

2.4- Sous-cutanée (SC, LQ)

La contention de l'animal doit permettre une certaine mobilité de la peau. La peau dorsale est généralement privilégiée pour ce type d'administration. Si les injections sont répétées, on change les sites d'injections.

On saisie la peau et on la tire vers le haut, on insert l'aiguille à un angle de 30 à 45°. Il faut s'assurer que le bout de l'aiguille est bien sous la peau.

Si l'injection est réussie, il se formera un petit gonflement sous la peau.

Après l'injection, on applique une légère pression pour empêcher le retour du produit injecté.



injection sous- cutanée

2.5- Intravasculaire

Les veines gauche et droite arrière latéraux sont la voie d'accès la plus courante utilisée en IV chez les souris et les rats. D'autres voies d'accès vasculaires sont possibles chez les souris et les rats, mais exigent généralement une sédation et soulagement de la douleur post-injection.

Pour une injection dans la veine caudale, retenir l'animal dans une boîte de contention. La queue est placée sous une lampe ou sur un dispositif de réchauffement protégé. Cette pratique permet de promouvoir la dilatation des veines et faciliter ainsi l'injection.

La queue est ensuite tenue par la pointe et est retournée d'un ¼ de tour pour voir les veines (latérale ou dorsale). L'insertion de l'aiguille se fait avec un angle de 15-20°. L'injection se fait lentement. Le succès de l'injection se traduit par un blanchiment transitoire de veine au point de l'injection.

2.6- Intragastrique (gavage)

Le gavage ne doit se faire que sur les animaux sobres et éveillés. L'anesthésie ou la sédation augmente le risque d'aspiration du produit et son passage dans les poumons.

Des aiguilles spéciales, appelées sondes de gavage sont utilisées. Elles ont des pointes à billes à la fin pour empêcher leur passage dans la trachée.

L'animal est retenu de telle sorte que sa tête et le corps sont dans une ligne droite verticale. Cette contention redresse l'œsophage, ce qui facilite le passage de l'aiguille d'alimentation.

On insère la pointe de la sonde dans la bouche de l'animal, sur la langue. Une fois que le bout de la sonde est en place, on pousse la sonde en appuyant doucement contre le palais. Si une tension est ressentie empêchant le passage de la sonde, on peut l'ajuster et la rediriger légèrement.

On continue à passer de la sonde jusqu'à ce que la distance prédéterminée est atteinte. L'aiguille doit passer facilement, et l'animal ne doit pas haleter ou de s'étouffer.

Une fois la sonde est en place, on applique l'administration la substance. Elle doit s'écouler dans l'estomac.



Administration intragastrique

3- Prélèvement de sang

3.1 Conséquences pathophysiologiques des prélèvements de sang :

Le volume-minute du coeur est diminué après le prélèvement d'une quantité importante de sang. L'organisme essaye de compenser cette diminution et la chute de pression artérielle provoquée en augmentant la fréquence cardiaque, le reflux veineux et la résistance périphérique. La perte de volume est compensée en quelques heures par un transfert de liquide de l'espace extra-cellulaire vers l'espace intra-vasculaire, ainsi que par une excrétion diminuée d'urine et par le fait de boire davantage. Si une certaine limite est dépassée, le corps ne peut plus compenser la perte de sang malgré ses mécanismes compensatoires. L'apport d'oxygène insuffisant provoque des lésions cellulaires et tissulaires irréversibles. Des toxines sont libérées provoquant des dommages supplémentaires. Tandis que la force de contraction du muscle cardiaque s'affaiblit, le sang s'écoule de plus en plus hors des vaisseaux dont la perméabilité est augmentée. Ceci diminue de plus en plus le volume-minute du cœur jusqu'à ce que l'animal meure.

- Un prélèvement de **10 %** du volume sanguin ne provoque pas d'effets notables sur le volume d'éjection cardiaque ou sur la pression artérielle.
- Une perte de sang brusque de **20 à 27 %** du volume sanguin peut être compensée sans chute de pression artérielle par les mécanismes compensatoires cités ci-dessus.
- Un prélèvement unique de **30%** du volume sanguin provoque une hypovolémie, également utilisée comme modèle standard dans la recherche.
- Les mécanismes compensatoires de l'organisme ne suffisent plus à corriger la perte de sang lors d'un prélèvement entre **30 et 40%** du volume sanguin.

3.2. Choix de la technique

Le choix de la technique se base sur l'espèce utilisée, sur l'accessibilité des vaisseaux, sur la quantité de sang nécessaire, sur le nombre et la fréquence des prélèvements ainsi que sur l'expérience pratique de la personne effectuant la prise de sang.

On choisira la technique la plus ménageant pour l'animal lorsqu'on a le choix. La taille de la canule doit être adaptée au vaisseau ainsi qu'à la quantité et à la qualité de sang requise. L'implantation de cathéters doit se faire de manière antiseptique. Comme chaque anesthésie générale, surtout si elle est exécutée fréquemment, inflige une contrainte à l'animal, il faut toujours envisager la possibilité d'employer des techniques de prélèvement qui n'en nécessitent pas. Si l'on ne peut pas renoncer à une technique nécessitant une anesthésie générale, on choisira le procédé de narcose le plus approprié.

3.3. Volumes de prélèvement

On choisira les volumes en tenant compte de la fréquence des prélèvements, des limites des mécanismes compensatoires patho-physiologiques et de la vitesse de régénération des cellules sanguines. Un individu ne subit pas de contrainte notable (c'est-à-dire ne relevant pas de la protection

des animaux) lors d'une perte de sang que s'il peut la compenser sans chute de la pression artérielle. L'expérience nous montre que cela est le cas chez les rongeurs et les lapins de laboratoire, lorsque pas plus de 20 % de la valeur inférieure du volume sanguin total estimé sont prélevés en l'espace de deux semaines. Le tableau ci-dessous contient des exemples pour les volumes de prélèvement sur des animaux de poids différents.

Tableau 1 : volumes de sang prélevé en fonction de l'espèce.

Espèce animale	Poids corporel	Volume sanguin total	Volume du prélèvement ¹⁾
Rat	100 g	5 - 7 ml	1 ml
	200 g	10 - 14 ml	2 ml
	300 g	15 - 21 ml	3 ml
Souris	20 g	1,4 - 1,6 ml	0,28 ml
	30 g	2,1 - 2,4 ml	0,42 ml
Gerbille	80 g	4,8 - 6,8 ml	1 ml
Cobaye	400 g	26,8 - 36,8 ml	5,4 ml
	600 g	40,2 - 55,2 ml	8 ml
Hamster	150 g	9,75 - 12 ml	2 ml
Lapin	3,5 kg	154 - 245 ml	31 ml

¹⁾ 20 % de la valeur inférieure du volume sanguin total estimé peuvent être prélevés en une fois ou en l'espace de deux semaines

3.4. Techniques de prélèvement de sang à recommander, acceptables ou à rejeter

La technique adéquate doit être choisie en fonction du volume de sang nécessaire et de la fréquence des prélèvements. Les techniques très contraignantes pour les individus de l'espèce animale visée ou celles qui peuvent être remplacées par des techniques moins contraignantes sont à rejeter. Les remarques concernant les techniques de prélèvement présentées ci-dessous ne sont pas exhaustives. Les techniques de prélèvements les plus courantes sont commentées.

3.4.1. La ponction de la veine caudale latérale

C'est, pour les prélèvements allant jusqu'à 0,15 ml, la technique à choisir chez le rat. Avec de la routine, elle est facile à effectuer et la contrainte subie par les animaux est minimale. On peut renoncer à une anesthésie générale étant donné qu'une contention de l'animal suffit. Avant le prélèvement de sang, la queue doit être baignée dans de l'eau ayant une température maximale de 45° C afin de provoquer une vasodilatation. Chez la souris, on peut également effectuer une ponction de la veine caudale, mais elle présente le désavantage que le volume maximal obtenu est très variable.



3.4.2 Incision de la veine caudale

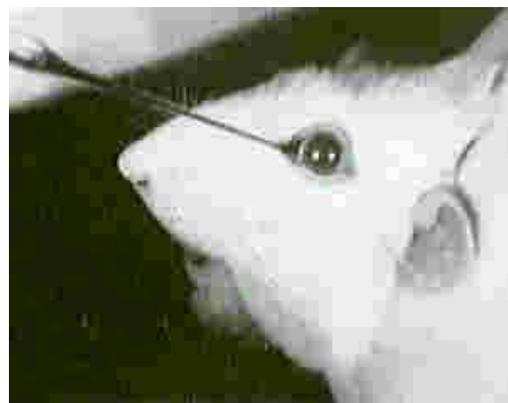
Recommandée chez la souris, avec une lame tranchante est pour les prélèvements allant jusqu'à 0,1 ml de sang. Cette méthode est également recommandée pour des prélèvements répétés. Une vasodilatation est nécessaire comme pour la ponction de la veine caudale.

3.4.3 La ponction de la veine linguale

Recommandée chez le rat, lorsque des quantités supérieures à 0,15 ml de sang sont nécessaires. L'intervention est facile à effectuer, il faut toutefois avoir un aide qui compresse la veine. La ponction de la veine linguale doit toujours être effectuée **sous anesthésie générale**. Pour la prise de sang, on prend la langue avec les doigts et on la ponctionne avec une aiguille fine. Le saignement peut ensuite être stoppé à l'aide de préparations hémostatiques (par ex. une solution de chlorure de fer à 10-20 %). La prise de sang peut être répétée plusieurs fois à court intervalle. Il faut envisager la possibilité de sacrifier l'animal si, suite à la ponction, il refuse la nourriture pendant plus d'un jour.

3.4.4 Le prélèvement rétrobulbaire

Acceptable chez la gerbille et le hamster. Il est également acceptable, si plus de 0,15 ml de sang sont nécessaires chez le rat et le cobaye et plus de 0,1 ml chez la souris. Il doit être rejeté dans tous les cas chez le lapin pour lequel il existe des alternatives moins contraignantes. La technique du prélèvement rétrobulbaire est difficile et ne doit être effectuée que par du personnel ayant de la routine avec des animaux sous anesthésie générale. Des manipulations inadéquates peuvent provoquer des **hématomes** ou une **cécité**.



3.4.5 La ponction de la veine marginale de l'oreille

C'est la méthode à choisir chez le lapin. La vasodilatation, si elle est nécessaire, peut être provoquée par une détention pendant dix à quinze minutes dans une cage chauffée à une température de 30° C (sous surveillance!) ou par l'application d'une substance légèrement irritante qui sera enlevée de l'oreille après le prélèvement de sang.

3.4.6 La ponction cardiaque

Cette méthode est justifiée chez le cobaye, le hamster et la gerbille si le prélèvement sanguin est effectué sous anesthésie générale par du personnel expérimenté. La ponction cardiaque est à rejeter chez le lapin, le rat et la souris pour lesquels on dispose d'autres techniques. La ponction cardiaque comporte toujours pour l'animal le risque d'un arrêt cardiaque ou d'un tamponnement cardiaque. Pour cette raison, on ne choisira cette technique que si le



volume nécessaire ne peut être obtenu par une méthode moins contraignante et que si la saignée sous anesthésie générale n'entre pas en ligne de compte. Des ponctions répétées entraînent des complications. Cette technique ne peut donc être appliquée que deux fois.

4- Euthanasie des animaux de laboratoire

Le terme euthanasie signifie « mort douce ». Dans le contexte de l'utilisation des animaux en science, ce terme fait référence à une « mise à mort conforme à l'éthique » ou à faire ce qui est humainement possible pour réduire au minimum la douleur et la détresse selon les circonstances, notamment les objectifs de la recherche.

4-1- Méthodes d'euthanasie acceptables

Les méthodes acceptables sont celles qui sont simples à exécuter et qui provoquent systématiquement la mort avec un minimum de douleur et de détresse lorsqu'elles sont employées chez des animaux conscients ou ayant reçu un sédatif.

4.1.1 Méthodes chimiques

Les méthodes chimiques pour la mise à mort éthiquement acceptable des animaux d'expérimentation comprennent les agents qui sont administrés par voie respiratoire (p. ex. les gaz et les agents anesthésiques volatiles), par injection (p. ex. les barbituriques) ou par absorption par d'autres voies (p. ex. la TMS).

4.1.1.1 Anesthésiques par inhalation

- En général, une surdose d'un agent anesthésique par inhalation s'avère une méthode efficace d'euthanasie pour un grand nombre d'espèces. La période précédant la mort peut cependant être assez longue. Par conséquent, le recours à une seconde méthode visant à s'assurer de la mort est recommandé à partir du moment où l'animal a perdu connaissance à la suite de l'administration de l'anesthésique.

- Les anesthésiques pour inhalation ne sont pas appropriés pour les espèces aquatiques ou les espèces qui retiennent leur souffle. Tout mélange de gaz inertes (Ar, N₂) avec de l'air extérieur ou du CO₂ est acceptable pour la volaille, pourvu que le pourcentage de CO₂ soit inférieur à 30 % v/v et que celui de l'O₂ soit inférieur à 2 % v/v (EFSA, 2005).

4.1.1.2 Anesthésiques par injection

Théoriquement, les anesthésiques devraient être administrés par injection intraveineuse (i.v.) sauf si l'animal est trop petit; dans ce cas, une injection intrapéritonéale (i.p.) devrait être effectuée. Lorsque la voie d'administration intrapéritonéale est utilisée, les personnes qui exécutent la procédure devraient être sensibilisées à la nécessité de s'assurer que le pH des médicaments formulés pour l'administration intraveineuse n'est pas irritant. Ceci est particulièrement important dans le cas des barbituriques qui représentent une méthode d'euthanasie efficace pour la plupart des espèces.

4.1.1.3 Immersion

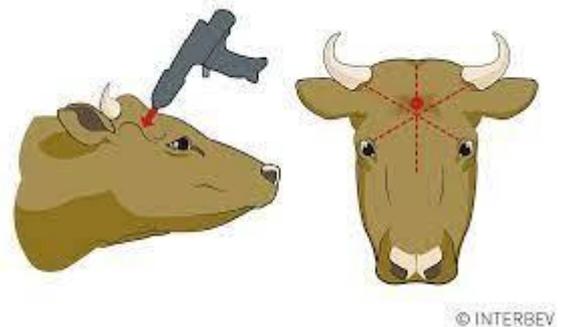
L'utilisation d'une méthode d'immersion (comme l'immersion dans la TMS ((méthanesulfonate de tricaine), la benzocaïne,)) doit être suivie par une méthode physique ou chimique pour provoquer la mort cérébrale. La TMS pour l'euthanasie des amphibiens et des poissons est une méthode recommandée. Cependant, ce produit est acide et doit être tamponné (Cakir et Strauch, 2005). Les méthodes d'immersion peuvent être faibles ou inefficaces chez les poissons qui retiennent leur souffle ou qui respirent.

4.1.2 Méthodes physiques

Les méthodes physiques doivent seulement être utilisées par des personnes hautement compétentes. Un certain nombre de méthodes physiques pour la mise à mort des animaux n'ont pas été incluses comme méthodes acceptables en raison de la possibilité de douleur ou de détresse grave si elles ne sont pas correctement effectuées.

4.1.2.1 Méthodes d'étourdissement mécanique

Lorsque l'étourdissement avec pistolet à cheville pénétrante ou la commotion cérébrale au moyen d'un étourdisseur non pénétrant sont utilisés. Il est recommandé de s'assurer de la mort de l'animal en effectuant une deuxième procédure comme l'exsanguination, la libération d'air comprimé dans le crâne ou la décérébration pour léser les parties profondes du cerveau et pour prévenir les convulsions (EFSA, 2005).



4.1.2.2 Macération

La macération est une méthode acceptable pour les poissons mesurant moins de 2 cm si le matériel spécialement conçu à cette fin est utilisé.

4-2-Méthodes acceptables sous condition

D'autres méthodes pour la mise à mort des animaux d'expérimentation peuvent être acceptables dans certaines circonstances pour lesquelles il existe une justification scientifique. Ces méthodes ne font pas partie de celles considérées « acceptables » parce qu'elles posent un plus grand risque pour la personne qui effectue la procédure de commettre des erreurs ou d'avoir un accident, elles peuvent ne pas systématiquement entraîner une mort sans cruauté ou elles ne sont pas bien scientifiquement documentées.

4.2.1 Dioxyde de carbone

Peu importe l'espèce animale, le dioxyde de carbone n'est pas un choix idéal en matière de méthode de mise à mort éthiquement acceptable. Le CO₂ est une méthode d'euthanasie fréquemment employée pour les rongeurs, notamment lorsque le nombre d'animaux est élevé, par exemple aux fins d'obtenir des tissus ou de mettre à mort les animaux à la fin d'une étude.

Pour l'inhalation du CO₂, les animaux sont placés dans un conteneur transparent fermé. Idéalement, ils sont laissés dans leur cage habituelle. Les animaux doivent rester suffisamment longtemps dans ce conteneur. Le taux de remplissage et la durée de séjour des animaux dans le conteneur doivent être choisis en fonction de l'espèce.



4.2.2. Exsanguination

Les animaux doivent avoir perdu connaissance (p. ex. anesthésie profonde) avant de commencer la procédure d'exsanguination. La sédation avant l'exsanguination ne garantit pas la perte de connaissance.

4.2.3. Commotion cérébrale

Un coup percutant à la tête est une méthode d'euthanasie acceptable sous condition qui peut être appropriée pour la mise à mort d'urgence des animaux de petite taille ayant un crâne mou. La mort de l'animal doit être assurée par une méthode secondaire, et la personne qui effectue la procédure doit avoir les compétences requises. Cette méthode est acceptable sous condition pour l'euthanasie des poissons et pour la mise à mort d'urgence d'autres espèces. Dans tous les cas où elle est choisie, elle devrait être exécutée de façon à ce que l'animal perde conscience presque instantanément, et dans une zone hors du champ sensoriel d'autres animaux.

4.2.4. Dislocation cervicale

Les animaux devraient être anesthésiés avant de procéder à une dislocation cervicale, sauf si cela brouille les résultats expérimentaux de l'étude. Des dispositifs commerciaux pour pratiquer la dislocation cervicale doivent être utilisés chez les rats de grande taille (plus de 200 g) et les lapins (plus de 2 kg). La dislocation cervicale manuelle devrait être effectuée seulement si le nombre d'animaux est relativement petit, et ce,



(PHOTO: Cervical Dislocation)

afin de prévenir les erreurs humaines dues à la fatigue et seulement chez les oiseaux pesant moins de 3 kg, les rongeurs de moins de 200 g et les lapins de moins de 1 kg. Une formation est nécessaire afin de s'assurer que la dislocation se fait au niveau cervical de la colonne vertébrale et non plus bas. À la fin de la procédure, il est essentiel de s'assurer que le cou est brisé en palpant les vertèbres. Si une

séparation adéquate n'est pas constatée, une méthode d'appoint, comme la décapitation ou l'exposition à de fortes concentrations de CO₂, devrait immédiatement être utilisée.

4.2.5. Décapitation

Pour les rongeurs et les oiseaux, la décapitation est considérée être acceptable sous condition. La durée de l'état de conscience résiduel pouvant persister au niveau de la tête sectionnée d'un animal après la décapitation est débattue dans la documentation scientifique. Cependant, le stress de la manipulation et de la contention doit également être pris en compte. L'emploi de l'anesthésie avant la décapitation rend cette méthode d'euthanasie acceptable.

La décapitation est souvent employée lorsque les méthodes chimiques peuvent brouiller les résultats de recherche. Lorsque la décapitation est employée, les lames devraient toujours être affûtées et les guillotines devraient être bien entretenues et nettoyées après chaque usage afin d'éviter la présence d'indices olfactifs.

Les membres du personnel qui effectuent la décapitation doivent recevoir une formation sur l'utilisation appropriée et sécuritaire du matériel.



4-3- L'euthanasie des fœtus et des nouveau-nés

Il n'existe pas suffisamment de renseignements scientifiques pour déterminer si les anesthésiques pour inhalation administrés aux nouveau-nés leur causent de la douleur ou de la détresse. Cependant, les fœtus et les nouveau-nés sont résistants à l'hypoxie et à l'hypercapnie. Les décisions devraient être prises au cas par cas, en tenant compte de la documentation disponible et d'une analyse des répercussions possibles sur le bien-être animal dans chaque situation.

4.3.1 Les fœtus de rongeurs avant les deux tiers de la gestation

Le développement neural à ce stade est infime et la nociception est peu probable. L'euthanasie de la mère ou l'élimination des fœtus devrait assurer une mort rapide de chaque fœtus due à la perte de l'irrigation sanguine et à la non-viabilité des fœtus à ce stade de développement.

4.3.2 Les fœtus de rongeurs après les deux tiers de la gestation et jusqu'à la naissance

Pendant le dernier tiers de la gestation, les fœtus devraient obtenir la même considération éthique que celle qu'obtiennent les animaux en pleine maturité. Le développement neuronal à ce stade soutient que la nociception est probablement présente, bien que la capacité à ressentir de la douleur ou à réagir à la douleur ait été contestée par Mellor et Gregory (2003).

Lorsque des fœtus sont requis pour une étude, l'euthanasie peut être provoquée par des anesthésiques chimiques administrés par une voie adaptée à la taille et au stade de développement de l'animal ainsi qu'à l'espèce en question. La décapitation avec des ciseaux bien effilés et entretenus ou la dislocation

cervicale est une méthode physique d'euthanasie acceptable pour les nouveau-nés. La congélation rapide dans de l'azote liquide, sans anesthésie préalable, comme seule méthode d'euthanasie n'est pas considérée éthiquement acceptable. Lorsqu'il faut procéder à la fixation chimique d'un fœtus en entier, l'animal devrait tout d'abord être anesthésié avant l'immersion ou la perfusion avec des solutions de fixation. L'anesthésie peut être provoquée par l'injection d'un anesthésique chimique dans le fœtus.

Lorsque des fœtus ne sont pas nécessaires pour une étude, la méthode choisie pour l'euthanasie d'une mère gestante devrait garantir une anoxie cérébrale rapide des fœtus en évitant toute perturbation du milieu utérin. Les méthodes recommandées sont l'anesthésie suivie d'une exposition au CO₂ avec ou sans dislocation cervicale de la mère. La mort de la mère doit faire l'objet d'une vérification après l'euthanasie et avant l'élimination de la carcasse.

4.3.3 Souris, rat et hamster nouveau-nés jusqu'au 10e jour après la naissance

Les méthodes acceptables d'euthanasie comprennent celles recommandées pour les rongeurs adultes. Des modifications peuvent cependant être nécessaires et on devrait recourir aux conseils d'un vétérinaire. Par exemple, lors de l'utilisation du CO₂ pour les souris et les rats nouveau-nés, la période précédant la mort varie considérablement selon l'âge et peut être considérablement plus longue que celle des adultes de la même espèce (Pritchett et al., 2005; Pritchett, 2009). Pritchett et al. (2005) signalent également des différences entre les lignées de souris nouveau-nées exposées au CO₂.

On peut avoir recours à l'immersion dans de l'azote liquide seulement si cette méthode est précédée d'une anesthésie. Dans le même ordre d'idées, l'anesthésie devrait précéder l'immersion ou la perfusion avec des composés chimiques utilisés pour la fixation des tissus.