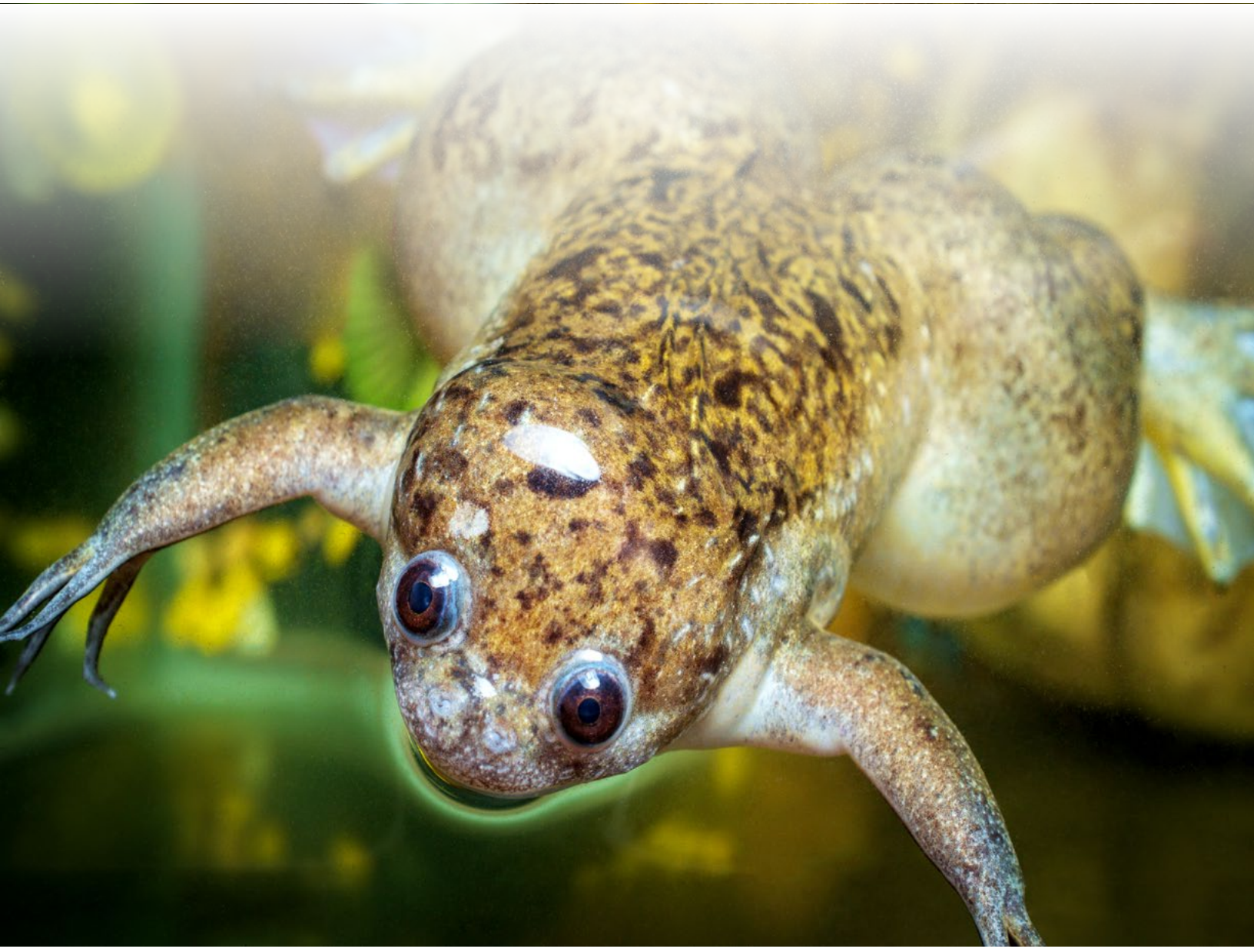
CCAC
CCPA

Canadian Council on Animal Care
Conseil canadien de protection des animaux



Lignes directrices du CCPA : les amphibiens

Date de publication : Août 2021

© Conseil canadien de protection des animaux, 2021

ISBN: 978-0-919087-93-4

190, rue O'Connor, bureau 800
Ottawa (Ontario) K2P 2R3

http://www.ccac.ca

REMERCIEMENTS

Le conseil d'administration du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) remercie vivement les membres du sous-comité sur les amphibiens qui ont mis leur expertise et leurs efforts à contribution dans l'élaboration des lignes directrices. Le conseil d'administration tient également à souligner la contribution essentielle de toutes les personnes qui ont proposé des suggestions au cours des deux périodes d'examen du document, et les membres du comité des normes et du comité d'évaluation et de certification qui ont fourni au sous-comité de lignes directrices des conseils importants. De plus, le conseil d'administration exprime ses meilleurs remerciements à l'équipe de projet du Secrétariat du CCPA pour son excellent travail ainsi qu'au docteur Frédéric Chatigny, pour la vérification de la version française. Le CCPA adresse ses sincères remerciements à ses bailleurs de fonds, les Instituts de recherche en santé du Canada et le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, pour leur soutien financier. Sans leur appui, le CCPA ne pourrait s'acquitter de son mandat actuel.



Docteur Chris Kennedy
Président du conseil d'administration du CCPA



Monsieur Pierre Verreault
Directeur général du CCPA

SOUS-COMITÉ SUR LES AMPHIBIENS

Dr Frédéric Chatigny (président)
M. Jason Allen, Trent University
Dre Anne-Marie Catudal, Université Laval
Dre Winnie Chan, Mass General Brigham
M. Dan Fryer, Greater Moncton SPCA
Dre Valérie Langlois, Institut national de la recherche scientifique
Dre Hillary Maddin, Carleton University
Dr Stéphane Roy, Université de Montréal
Mme Alison Weller, Agence canadienne d'inspection des aliments

TABLE DES MATIÈRES

PRÉFACE **1**

SOMMAIRE DES PRINCIPES DIRECTEURS **2**

1. INTRODUCTION **6**

1.1 Biologie comportementale 8
1.2 Capacités sensorielles 9
1.3 Anatomie et physiologie 9
1.4 Sources de variations 10
1.4.1 Souche 11
1.4.2 Étape du cycle de vie 11
1.4.3 Différences individuelles : sexe et état de santé 11
1.4.4 Effets de l'environnement et de l'expérience de vie 11

2. INSTALLATIONS AQUATIQUES **13**

2.1 Salles d'hébergement et salles d'intervention 13
2.1.1 Approvisionnement en eau 14
2.2 Vivariums et aquariums de laboratoire 15
2.2.1 Conditions spatiales 16
2.2.2 Conception des vivariums et des aquariums 17
2.2.3 Système aquatique 18
2.2.4 Substrat 18
2.2.5 Aménagement 18

3. GESTION ET PERSONNEL DE L'INSTALLATION **20**

3.1 Gestion de l'environnement 20
3.1.1 Éclairage 20
3.1.2 Température et humidité relative 21
3.1.3 Qualité de l'air et de l'eau 24
3.1.4 Sons et vibrations 26
3.2 Lutte contre les organismes nuisibles 26
3.3 Personnel 27

4. ACQUISITION **28**

4.1 Source 28
4.2 Lois et règlements 28
4.3 Préparation du transport 29

4.4 Transport 29
4.4.1 *Xenopus* 31
4.4.2 Larves 31
4.5 Réception des amphibiens 32
4.6 Quarantaine et acclimatation après la réception des animaux 32
4.6.1 *Xenopus* 33
4.6.2 Axolotls 34

5. ÉLEVAGE 35

5.1 Âge et état de reproduction 35
5.1.1 *Xenopus* 36
5.1.2 Axolotls 36
5.2 Considérations concernant la reproduction 36
5.2.1 *Xenopus* 36
5.2.2 Axolotls 37
5.3 Induction de la reproduction en captivité 37
5.3.1 *Xenopus* 37
5.3.2 Axolotls 38
5.4 Œufs 38
5.5 Soins de la progéniture 39
5.5.1 *Xenopus* 39
5.5.2 Axolotls 40

6. SOINS ET GESTION 41

6.1 Identification 41
6.2 Observation 41
6.3 Conditions d'hébergement 41
6.3.1 *Xenopus* 42
6.3.2 Axolotls 42
6.4 Alimentation et eau 43
6.4.1 *Xenopus* 44
6.4.2 Axolotls 45
6.5 Enrichissement environnemental 45
6.5.1 *Xenopus* 46
6.5.2 Axolotls 47
6.6 Manipulation et contact humain 47
6.6.1 *Xenopus* 47
6.6.2 Axolotls 48
6.7 Nettoyage et désinfection 48
6.8 Registres 49

7. MANIPULATION ET CONTENTION 50

7.1 Manipulation 50
7.2 Contention physique 50
7.3 Contention chimique 51

8. SANTÉ ET PRÉVENTION DES MALADIES 52

8.1 Prévention des maladies 52
8.2 Surveillance de l'état de santé et détection des maladies 53
8.2.1 Maladies fréquentes 54
8.3 Lutte contre les maladies en cas d'éclosion infectieuse 55

9. ÉVALUATION DU BIEN-ÊTRE ANIMAL 57

9.1 Indicateurs du bien-être 58
9.1.1 *Xenopus* 59
9.1.2 Axolotls 59

10. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES 60

10.1 Modèles animaux 62
10.2 Administration de substances 62
10.2.1 *Xenopus* 62
10.2.2 Axolotls 62
10.3 Prélèvements de liquides corporels ou de tissus 63
10.3.1 Sang 63
10.3.2 Urine et fèces 64
10.4 Implants 64
10.5 Procédures chez les amphibiens génétiquement modifiés 64
10.5.1 Prélèvement d'échantillons pour le génotypage 65
10.5.2 Phénotypage 65
10.6 Imagerie 65
10.7 Études comportementales 66
10.8 Contrôle de la consommation d'aliments et de liquides 66
10.9 Prélèvement d'ovocytes 66
10.10 Anesthésie et analgésie 67
10.10.1 Anesthésie 67
10.10.2 Analgésie 70
10.11 Intervention chirurgicale 71
10.12 Surveillance et soins post-intervention 71

11. EUTHANASIE 72

11.1 Immersion ou administration d'un agent topique 72
11.2 Méthode par injection 73
11.3 Agents anesthésiques inhalés 73

11.4 Méthodes physiques 73
11.5 Autres méthodes 74
11.6 Euthanasie des larves 74

12. FIN DE L'ÉTUDE 75

12.1 Transfert d'amphibiens entre établissements ou protocoles 75
12.2 Adoption des animaux 75
12.3 Mise en liberté 75
12.4 Élimination des animaux morts 75

13. SÉCURITÉ DES PERSONNES 76

RÉFÉRENCES 78

ANNEXE 1
ESPÈCES COURAMMENT UTILISÉES EN LABORATOIRE ET AUTRES RESOURCES 88

ANNEXE 2
MÉTHODES D'IDENTIFICATION 92

GLOSSAIRE 95



Les amphibiens

PRÉFACE

Le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) est l'organisme national chargé d'établir et d'appliquer, selon le principe d'évaluation par les pairs, des normes élevées en matière de pratiques éthiques de soins et d'utilisation des animaux dans le domaine scientifique au Canada.

Le document *Lignes directrices du CCPA : les amphibiens* s'adresse aux chercheurs et aux directeurs d'étude, aux comités de protection des animaux, aux gestionnaires d'animaleries, aux vétérinaires et personnel de soins et vise l'amélioration des soins donnés aux amphibiens et des procédures expérimentales qui les touchent. Ce document traite des conditions expérimentales liées aux amphibiens. Si les conditions requises pour une étude s'écartent des présentes lignes directrices, elles doivent être justifiées auprès du comité de protection des animaux et approuvées par celui-ci.

Les lignes directrices du CCPA ont pour but d'aider à l'application des Trois R, soit le remplacement, la réduction et le raffinement, en ce qui concerne les animaux en science (Russell et Burch, 1959). Élaborées à partir de l'expertise de pairs et de l'interprétation actuelle des connaissances scientifiques, elles proposent un cadre pour la mise en œuvre de pratiques évolutives fondées sur des données probantes. De telles pratiques devraient favoriser l'amélioration continue du bien-être des animaux.

En ce qui concerne les recherches à l'extérieur du Canada, les chercheurs qui travaillent pour des établissements certifiés par le CCPA sont assujettis aux présentes lignes directrices en plus de devoir suivre la législation et la réglementation sur le traitement éthique des animaux en vigueur dans le pays où est menée l'étude.

SOMMAIRE DES PRINCIPES DIRECTEURS

La liste suivante de principes directeurs résume les aspects les plus importants des soins aux amphibiens et de leur utilisation en science. Chaque principe est décrit en détail dans le document, avec des précisions et des références pour faciliter leur mise en œuvre. Dans ce document, l'emploi du verbe « devoir » au présent de l'indicatif (« doit ») indique une obligation à respecter sans exception. Quant à son emploi au conditionnel présent (« devrait »), il indique une obligation pour laquelle toute exception doit être justifiée auprès d'un comité de protection des animaux et approuvée par ce dernier.

2. INSTALLATIONS AQUATIQUES

Principe directeur 1

L'installation doit fournir aux amphibiens une eau de bonne qualité pour le maintien de leur état de santé.

Section 2.1.1 Approvisionnement en eau, p. 14

Principe directeur 2

La dimension et la complexité des vivariums et des aquariums doivent permettre aux amphibiens de démontrer des comportements importants pour leur bien-être.

Section 2.2 Vivariums et aquariums de laboratoire, p. 15

3. GESTION ET PERSONNEL DE L'INSTALLATION

Principe directeur 3

Les pratiques de gestion de l'animalerie doivent viser à faire en sorte que le milieu (la pièce et le vivarium ou l'aquarium) permet d'assurer le maintien de la santé et du bien-être des animaux et du personnel, et offre l'uniformité nécessaire à des résultats de recherche cohérents.

Section 3.1 Gestion de l'environnement, p. 20

Principe directeur 4

On doit mesurer régulièrement la qualité de l'eau.

Section 3.1.3.2 Qualité de l'eau, p. 24

Principe directeur 5

Chaque amphibien doit faire l'objet d'une observation quotidienne effectuée par une personne qualifiée et, autant que possible, sans déranger l'animal.

Section 3.3 Personnel, p. 27

4. ACQUISITION

Principe directeur 6

Les installations et les chercheurs doivent connaître et respecter les lois et politiques internationales, fédérales et provinciales ou territoriales qui s'appliquent pour l'acquisition, le transport et l'utilisation des amphibiens à des fins de recherche.

Section 4.2 Lois et règlements, p. 28

Principe directeur 7

Avant le départ, le fournisseur et le destinataire doivent s'entretenir au sujet du transport, du bien-être et des soins des amphibiens.

Section 4.3 Préparation du transport, p. 29

Principe directeur 8

La santé et le bien-être des amphibiens doivent être vérifiés à leur arrivée par des employés qualifiés en soins animaliers.

Section 4.5 Réception des amphibiens, p. 32

Principe directeur 9

Les amphibiens devraient être soumis à une période de quarantaine et d'acclimatation après le transport et avant leur utilisation dans des études.

Section 4.6 Quarantine et acclimatation après la reception des animaux, p. 32

5. ÉLEVAGE

Principe directeur 10

Des paramètres spécifiques associés à la santé des reproducteurs devraient être établies pour chaque espèce et être respectées avant toute tentative de reproduction.

Section 5.1 Âge et état de reproduction, p. 35

6. SOINS ET GESTION

Principe directeur 11

L'enrichissement environnemental doit être évalué en fonction de l'espèce d'amphibiens et de l'étape de son cycle de vie.

Section 6.5 Enrichissement environnemental, p. 45

7. MANIPULATION ET CONTENTION

Principe directeur 12

Les amphibiens devraient être manipulés seulement si nécessaire et le moins longtemps possible.

Section 7.1 Manipulation, p. 50

8. SANTÉ ET LUTTE CONTRE LES MALADIES

Principe directeur 13

Le programme de santé animale devrait être destiné à tous les amphibiens, sans exception, qu'ils soient hébergés dans l'animalerie principale ou ailleurs dans les installations de l'établissement.

p. 52

Principe directeur 14

Des mesures stratégiques pour la prévention des maladies devraient inclure un programme de prévention des maladies et des mécanismes de suivi et de rapports périodiques d'évaluation de l'état de santé.

Section 8.1 Prévention des maladies, p. 52

Principe directeur 15

Des procédures normalisées de fonctionnement devraient être établies pour évaluer la santé de l'animal, fournir des soins et traiter des problèmes de santé courants chez les animaux et, afin d'en assurer la pertinence, elles devraient être examinées tous les trois ans.

Section 8.2 Surveillance de l'état de santé et détection des maladies, p. 53

Principe directeur 16

Il doit y avoir un plan de lutte contre les maladies en cas d'éclosion imprévue.

Section 8.3 Lutte contre les maladies en cas d'éclosion infectieuse, p. 55

9. ÉVALUATION DU BIEN-ÊTRE ANIMAL

Principe directeur 17

Le bien-être de tous les amphibiens hébergés dans un établissement doit être régulièrement évalué.

p. 57

10. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

Principe directeur 18

La méthode la moins invasive et la mieux adaptée aux objectifs de l'étude doit être utilisée, et tenir compte des répercussions possibles des procédures chez les amphibiens et des mesures à mettre en œuvre pour les réduire.

p. 60

Principe directeur 19

Les points limites doivent être établis et approuvés par le comité de protection des animaux avant le début de l'étude pour réduire le plus possible les effets négatifs des procédures expérimentales chez l'animal.

p. 61

Principe directeur 20

On doit utiliser des anesthésiques dans les procédures qui seront source de stimuli nocifs ou dans les cas où il y aura d'importantes manipulations qui seront vraisemblablement source de traumatismes et d'atteinte physiologique chez les amphibiens.

Section 10.10.1 Anesthésie, p. 67

Principe directeur 21

Les amphibiens doivent être constamment surveillés pendant l'anesthésie, de l'induction à la récupération.

Section 10.10.1 Anesthésie, p. 67

Principe directeur 22

Conformément au principe de précaution, on devrait recourir à l'analgésie sur les amphibiens avant de réaliser une procédure qui, selon les meilleures données scientifiques disponibles, risque d'être douloureuse.

Section 10.10.2 Analgésie, p. 70

11. EUTHANASIE

Principe directeur 23

L'euthanasie des amphibiens doit être effectuée par du personnel compétent, selon la méthode la moins invasive et la mieux adaptée à l'espèce, à l'étape du cycle de vie de l'animal et aux objectifs de l'étude.

p. 72

1 INTRODUCTION

Dans ce document, l'emploi du verbe « devoir » au présent de l'indicatif (« doit ») indique une obligation à respecter sans exception. Quant à son emploi au conditionnel présent (« devrait »), il indique une obligation pour laquelle toute exception doit être justifiée auprès d'un comité de protection des animaux et approuvée par ce dernier.

Les amphibiens forment une classe de vertébrés ectothermes (à sang froid), classés en trois familles : les anoures (crapauds, grenouilles), les urodèles (salamandres, tritons) et les gymnophiones (cécilies). Le développement des amphibiens comprend généralement une métamorphose caractérisée par le passage de la larve aquatique à l'adulte semi-terrestre. Néanmoins, les œufs de certaines espèces éclosent directement sans passer par un stade larvaire (p. ex. certaines salamandres pléthodontidés) tandis que d'autres (p. ex. *Ambystoma mexicanum*) passent toute leur vie à l'état larvaire.

Les différentes espèces d'amphibiens présentent un large éventail d'adaptations et ont des exigences environnementales diverses (Elinson et del Pino, 2012). Les amphibiens sont profondément différents des mammifères. Ils ont besoin d'une communauté microbienne fonctionnelle dans l'environnement immédiat afin de maintenir un microbiome cutané adéquat pour combattre les maladies. Il est donc essentiel d'être conscient des besoins individuels des animaux, ainsi que de la manière dont leur bien-être est influencé par le milieu d'hébergement et par toute étude à laquelle ils sont soumis.

Les *Lignes directrices du CCPA : les amphibiens* se concentrent sur les amphibiens dans les laboratoires et ceux gardés en captivité. Pour les études sur le terrain, y compris chez les animaux sauvages gardés en captivité pour une courte période[1], voir les *Lignes directrices du CCPA sur : le soin et l'utilisation des animaux sauvages* (CCPA, 2003b). Les œufs, embryons ou larves d'amphibiens qui se nourrissent à même leur vésicule vitelline et dont l'alimentation exogène n'a pas commencé sont exclus de ces lignes directrices[2], car le CCPA n'exige pas de protocole d'utilisation des animaux pour ces étapes du cycle de vie.

Ces lignes directrices s'appliquent à toutes les espèces d'amphibiens hébergées dans les installations canadiennes (voir l'annexe 1 pour une liste des espèces communément hébergées). Des précisions sont également fournies au sujet des principales espèces hébergées (*Xenopus laevis*[3] et *Ambystoma mexicanum* ou axolotl) lorsqu'elles sont disponibles. Étant donné la diversité au sein de ce groupe de vertébrés, les lignes directrices devraient être utilisées comme des normes générales pour les soins de ces animaux et leur utilisation en

1 Selon l'American Society of Ichthyologists and Herpetologists (2004), l'hébergement à court terme s'étend normalement de quelques jours ou semaines.

2 Par exemple, les lignes directrices s'appliquent aux anoures ayant atteints le stade 24 de la table de développement de Gosner; voir McDiarmid R. et Altig R. (2000) *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. University of Chicago Press.

3 Ces grenouilles sont connues surtout sous leur nom scientifique *Xenopus*, utilisé dans le présent document.

recherche. Il est essentiel que les personnes qui travaillent avec une espèce en particulier comprennent bien les exigences en matière d'hébergement, de soins et de gestion de l'espèce, connaissances qui peuvent être acquises par la recherche documentaire et la consultation de personnes-ressources (chercheurs, vétérinaires, experts et autres professionnels). S'il n'y a pas assez de données sur les conditions optimales pour l'espèce, les présentes lignes directrices et les caractéristiques de l'habitat naturel sont un point de départ valable qui devrait faire l'objet d'un suivi attentif afin d'apporter tout ajustement nécessaire.

Les amphibiens sont utilisés comme modèles pour les processus de développement et les processus physiologiques, comme les études de régénération des tissus, et plus récemment la recherche en génétique et en génomique (O'Rourke, 2007; Edholm et Robert, 2013). Les amphibiens jouent également un rôle important dans la recherche environnementale liée aux contaminants et aux changements du climat et de l'habitat (O'Rourke, 2007).

Voici quelques exemples des difficultés que peuvent présenter les études chez les amphibiens :

- les diverses conditions d'hébergement et de soins à chacune des étapes du cycle de vie;
- le manque de connaissances concernant le bien-être des amphibiens;
- les lacunes dans l'évaluation et le soulagement de la douleur, de l'inconfort et de la détresse;
- les données limitées sur les études comportementales;
- la petite taille de certains amphibiens pose des difficultés techniques pour les protocoles qui exigent la réalisation d'injections, de prélèvements sanguins et d'interventions chirurgicales;
- le maintien des conditions d'asepsie lors d'interventions chirurgicales;
- les éventuels effets négatifs sur le bien-être animal de modèles d'amphibiens génétiquement modifiés et de nouveaux modèles de maladies;
- le manque de disponibilité de certaines espèces auprès des fournisseurs;
- la capture dans des écosystèmes où des espèces d'amphibiens sont menacées;
- les préoccupations quant à la remise en liberté d'amphibiens sauvages gardés en captivité dans une animalerie.

Dans le domaine de la science faisant appel aux animaux, la validité scientifique des protocoles qui font appel à des amphibiens doit être démontrée, et les Trois R (remplacement, réduction, raffinement) de Russell et Burch (1959), doivent guider les décisions concernant la conception des études et les soins prodigués aux animaux. Lors de la conception, de la réalisation et de la présentation des études, il est important de tenir compte de la qualité, de la reproductibilité et de l'applicabilité des études pour s'assurer que le recours à des animaux est nécessaire et que les données obtenues contribuent à la recherche.

Lors de la planification et de la réalisation d'études avec des animaux, il est important de tenir compte du remplacement. On doit également examiner les stratégies de réduction pour recourir au plus petit nombre d'animaux requis pour obtenir suffisamment d'informations pour avoir une efficacité statistique, en plus de réduire au minimum les répercussions individuelles sur le bien-être animal. La taille de l'échantillon devrait être déterminée en faisant appel, au besoin, aux services d'un biostatisticien.

Ce document porte principalement sur le raffinement des études chez les amphibiens, à la fois des soins aux animaux et des procédures réalisées dans le cadre de protocoles qui doivent être approuvés par le comité de protection des animaux. Les animaux hébergés dans un environnement où les pratiques et les installations

visent la promotion du bien-être animal sont moins sujets au stress et plus susceptibles d'avoir des comportements et des traits physiologiques normaux (Poole, 1997).

Les premières sections constituent les assises des présentes lignes directrices, soit des notions de biologie comportementale liées au bien-être (section 1.1, « Biologie comportementale »), la description des capacités sensorielles (section 1.2, « Capacités sensorielles »), les caractéristiques anatomiques et physiologiques (section 1.3, « Anatomie et physiologie ») et la variabilité des comportements sociaux (section 1.4, « Sources de variations »). En plus de tous ces sujets qui touchent des enjeux du bien-être animal, il faut tenir compte des connaissances sur les caractéristiques de l'espèce (et de la souche le cas échéant), du sexe, de l'étape du cycle de vie et de l'individu pour examiner l'effet d'une procédure ou d'une condition expérimentale sur le bien-être des amphibiens et sur les résultats de la recherche.

Pour des ressources à consulter afin d'obtenir des renseignements supplémentaires concernant certaines espèces d'amphibiens, voir l'annexe 1.

1.1 BIOLOGIE COMPORTEMENTALE

Le bien-être des amphibiens repose sur un environnement en laboratoire qui tient compte des comportements naturels (en fonction de l'espèce) et qui y prévoit des aménagements pour permettre aux animaux de démontrer, le cas échéant, ces comportements. En général, le cycle biologique des amphibiens comprend un stade larvaire aquatique suivi d'une métamorphose vers la forme adulte; nonobstant les grandes variations dans le cycle biologique entre les espèces (Pough, 2007). La forme adulte peut, selon l'espèce, être exclusivement aquatique ou terrestre, ou encore prendre une forme semi-aquatique. Pough (2007) souligne que toute cette gamme est représentée chez les anoures (grenouilles et crapauds) et les *Caudata* (salamandres et tritons).

Selon les espèces d'amphibiens, les adultes utilisent diverses méthodes de locomotion comme le saut, la nage, la marche, la course, et peuvent aussi grimper (Pough, 2007). Durant la métamorphose, la présence de plateformes de repos permet d'éviter les noyades tant que les larves aquatiques ne sont pas devenues adultes. Comme les axolotls se métamorphosent très rarement en adultes de façon spontanée, les plateformes sont superflues, à moins qu'un suivi régulier indique leur nécessité.

Les amphibiens sont des animaux ectothermes qui régulent leur température corporelle par l'adoption d'un comportement adéquat (c'est-à-dire ils se placent dans un endroit au microclimat approprié) et par le refroidissement par évaporation (Tinsley, 2010). Les préférences en matière de température varient selon l'espèce, et peuvent aussi changer pour une même espèce selon la période du jour ou de l'année (Pough, 2007). Lors de conditions extrêmes, certaines espèces entrent dans un état de torpeur (Tinsley, 2010).

Les amphibiens juvéniles et adultes sont carnivores (ils se nourrissent essentiellement de petites proies comme les invertébrés). Quant au régime alimentaire des larves, il est plus diversifié et, chez certains amphibiens, comprend une phase herbivore (Tinsley, 2010).

Les amphibiens préfèrent généralement passer une grande partie de la journée à l'abri des regards (Pough, 2007), occupant les zones ombragées et évitant la lumière vive. De nombreux amphibiens sont nocturnes et se nourrissent la nuit (Pough, 2007). Les cycles de reproduction et la métamorphose sont également influencés, entre autres, par la photopériode (Pough, 2007).

Certains amphibiens ont tendance à être solitaires, sauf pendant la reproduction (Tinsley, 2010); d'autres préfèrent être en groupe. Il importe donc de connaître le type d'hébergement optimal pour chaque espèce.

Par ailleurs, le comportement social des amphibiens peut être complexe (Wells, 2007). Ils utilisent diverses stratégies pour communiquer avec leurs congénères et établir des hiérarchies et des territoires pour la saison de reproduction : signaux vocaux (Wells et Schwartz, 2007; Tobias et coll., 2004), parades (Hodl et Amézquita, 2001), signaux chimiques (Pough, 2007).

1.2 CAPACITÉS SENSORIELLES

De nombreux amphibiens utilisent la vision pour détecter la présence de proies. Ils réagissent aux mouvements de leurs proies, mais peuvent ne pas les voir si elles sont immobiles ou si elles sont de taille ou de forme corporelle différente des proies habituelles (Pough, 2007). Certains amphibiens, comme les salamandres, utilisent à la fois la vision et l'odorat pour détecter leurs proies, tandis que les *Xenopus* se fient beaucoup à leur odorat (Reed, 2005). Chez diverses espèces d'amphibiens, l'odorat permet également de réagir aux substances chimiques produites par les glandes cutanées lors de parade nuptiale et d'accouplement ou pour l'établissement du territoire (Woodley, 2014). L'anatomie de certains amphibiens (les larves tout comme les adultes) présente un système de lignes latérales, sensible aux changements des courants et de la pression de l'eau, qui peut jouer un rôle dans la localisation de la nourriture (O'Rourke, 2007) et de menaces naturelles comme les prédateurs.

La production de sons et l'audition ont été étudiées de manière approfondie chez certaines espèces (p. ex. les grenouilles), et très peu chez d'autres (p. ex. les salamandres). Néanmoins, des études montrent que les amphibiens peuvent entendre les sons aigus (bruits propagés dans l'air) et graves (vibrations propagées dans les substrats) (Capshaw et Soares, 2016). Certaines espèces produisent des signaux vocaux complexes qui sont utilisés pour l'accouplement et la défense du territoire. De plus, la structure de ces appels peut contenir des informations sur la condition physique et l'état reproductif d'un individu.

La gamme des fréquences perçues par les amphibiens s'étend de 10 Hz à 10 kHz (Heffner et Heffner, 2007; Capshaw et Soares, 2016). À titre comparatif, l'oreille humaine est sensible à la bande de fréquences comprises entre 20 Hz et 20 kHz. Les études sur les répercussions du bruit, sur le terrain ou en laboratoire, semblent indiquer que les sons forts, comme ceux émis par la circulation, peuvent entraîner une inhibition de la reproduction, une vigilance accrue et une augmentation des hormones de stress (Morgan et Tromborg, 2007; Tennessen et coll., 2014).

Les membres des trois ordres modernes d'amphibiens sont capables de détecter les vibrations du sol, capacité dont les espèces de la famille des Céciliens se servent pour creuser. Bien que les études en laboratoire sur les sons et les vibrations s'intéressent surtout aux mammifères, des preuves empiriques semblent indiquer que la reproduction chez les amphibiens est perturbée par les vibrations. Il se peut que les amphibiens ne manifestent pas de réaction au stress, comme les axolotls qui ne montrent aucune réaction comportementale évidente aux vibrations ou aux changements de lumière et de température, mais leur reproduction peut être affectée.

1.3 ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE

Il est très important de connaître l'anatomie et la physiologie de l'espèce hébergée ou étudiée. Ne pas tenir compte des caractéristiques propres à une espèce peut être préjudiciable au bien-être des animaux et peut avoir des répercussions négatives sur les études. Certaines des principales caractéristiques à l'égard des amphibiens sont mentionnées ci-après.

Les amphibiens ont une peau fine et perméable qui permet l'échange gazeux respiratoire (entre l'oxygène et le dioxyde de carbone) et le passage de l'eau de l'environnement à l'intérieur de leur corps (Pough, 2007). Les drogues et les substances toxiques peuvent également pénétrer par la peau. La peau des amphibiens contient des glandes (p. ex. les parotoïdes) qui sécrètent des substances toxiques pour se défendre contre les prédateurs et les organismes pathogènes.

La peau des amphibiens produit des substances antimicrobiennes, et le microbiome cutané joue un rôle essentiel dans la lutte contre les infections bactériennes et fongiques (Walke et Belden, 2016; Jiménez et Sommer, 2017). Chez de nombreuses espèces, la peau est protégée par une couche de mucus. Toute atteinte à cette couche protectrice peut provoquer des lésions ou des infections cutanées. En outre, l'environnement de laboratoire a des effets négatifs sur le microbiome des amphibiens (Bates et coll., 2019).

Pendant le cycle de mue, les amphibiens perdent la couche externe de la peau. La fréquence des mues est liée entre autres à la température, à la lumière ambiante (Cramp et coll., 2014) et à une maladie ou à une blessure (Ohmer et coll., 2015).

La plupart des amphibiens, y compris les espèces terrestres, ont besoin du milieu aquatique pour pondre. Les œufs sont recouverts d'une couverture gélatineuse protectrice, dont l'épaisseur varie en fonction de l'espèce et de l'environnement (Gomez-Mestre et coll., 2006). Le développement des larves et leur métamorphose en jeunes adultes sont influencés par les conditions environnementales (Denver, 2019). Par exemple, le rythme de développement et la taille des têtards des grenouilles léopards dépendent de la température (Wells, 2007).

Les amphibiens ont un système nerveux bien développé avec des nocicepteurs et des voies nerveuses permettant la perception et le traitement des stimuli nocifs (Guénette et coll., 2013). Les signaux nociceptifs sont transmis au système nerveux central; par contre, on ne sait pas encore si le message nociceptif est transmis au cerveau pour devenir une perception consciente de la douleur (Guénette et coll., 2013). Le principe de précaution devrait donc s'appliquer afin que tout soit mis en œuvre pour limiter les risques de souffrance.

De nombreux amphibiens ont la capacité de régénérer tous les différents tissus de leur corps comme les pattes, la mâchoire (Song et coll., 2010; Vieira et McCusker, 2018), la peau, la pointe du cœur, la moelle épinière, des parties du cerveau ou de l'intestin. Le phénomène de régénération tissulaire est étudié, notamment chez les salamandres (en particulier les axolotls et trois espèces de tritons) qui sont connues pour cette capacité unique (Joven et coll., 2019). De nombreux amphibiens sont capables de régénérer leurs tissus, mais la régénération représente une dépense énergétique (Maginnis, 2006). Cette capacité devrait être considérée lors d'interventions invasives pour prélever des tissus (p. ex. la coupe d'un orteil ou de la queue) qui, par ailleurs, entraînent probablement de la douleur.

L'absence de diaphragme chez les amphibiens fait que les médicaments injectés dans la cavité abdominale peuvent agir sur le circuit cœur-poumons de l'animal.

1.4 SOURCES DE VARIATIONS

La diversité interspécifique est bien documentée chez les amphibiens, toutefois la diversité intraspécifique doit également être prise en considération au moment de déterminer les exigences en matière d'hébergement, de soins et de gestion ainsi que d'évaluer les effets de chaque procédure sur le bien-être des animaux et l'interprétation des résultats d'une étude.

1.4.1 Souche

Quelques espèces d'amphibiens ont été soumises à des modifications génétiques (p. ex. introduction d'ADN étranger, invalidation de l'expression d'un gène), comme les axolotls et les *Xenopus*. Ainsi, il existe de multiples variétés de ces espèces, chaque souche ayant des génotypes et des phénotypes définis. Bien que la production d'amphibiens génétiquement modifiés a récemment augmenté, aucune souche génétiquement modifiée n'a été produite à ce jour pour la plupart des autres espèces pour lesquelles il n'y a que des types sauvages.

1.4.2 Étape du cycle de vie

De nombreux amphibiens, contrairement à d'autres tétrapodes, se métamorphosent pour devenir adultes (Tinsley, 2010). Cependant, la série de transformations qui permettent le passage du stade larvaire au stade adulte est propre à chaque espèce. Pour des informations sur les étapes du cycle de vie, voir Gosner (1960) pour les anoures, Nieuwkoop et Faber (1967) pour les *Xenopus*, Harrison (1969), Russell et Watson (2000), Kerney (2011) et Hurney et ses collègues (2015) pour diverses espèces de salamandres, et Armstrong et Malacinski (1989) et Nye et ses collègues (2003) pour les axolotls. Les exigences, que ce soit en matière de confinement, d'environnement ou de régime alimentaire, et les réactions, entre autres aux procédures effectuées, varient selon l'étape du cycle de vie, et diffèrent selon les espèces.

1.4.3 Différences individuelles : sexe et état de santé

En recherche, l'importance de reconnaître et de comprendre l'incidence des différences liées au sexe est bien établie (McCarthy et coll., 2012). McCarthy et ses collègues (2012) et Becker et ses collègues (2005) examinent les considérations pour déterminer la nature et la portée des différences liées au sexe pour améliorer la conception des études et l'interprétation des résultats expérimentaux. Un exemple typique chez les amphibiens est le dimorphisme sexuel de taille avec, pour la plupart des espèces, les femelles plus grandes que les mâles (Kupfer, 2007). Chez *Xenopus (Silurana) tropicalis*[4], les mâles et les femelles se comportent différemment, les mâles ayant un comportement plus exploratoire, et les individus sont classés en trois catégories au sein de chaque sexe, soit téméraire, intermédiaire ou timide (Videlier et coll., 2015). Le rythme saisonnier peut également influencer le comportement.

L'état de santé des amphibiens a des répercussions sur leur utilisation pour la recherche et l'élevage, et sur leurs besoins en matière de conditions d'hébergement. Bien que les maladies affectant les amphibiens ne soient pas aussi bien connues que les maladies chez de nombreux autres types d'animaux hébergés en laboratoire, des programmes de quarantaine ainsi que d'autres moyens de surveillance de l'état de santé et des agents pathogènes au sein de la colonie sont des éléments importants pour le maintien d'un certain état de santé (voir la section 8, « Santé et prévention des maladies »).

1.4.4 Effets de l'environnement et de l'expérience de vie

Les différences dans les conditions d'hébergement, de soins et de gestion peuvent entraîner des variations entre les individus d'une même espèce. Par exemple, la qualité des ovocytes diffère entre les *Xenopus* hébergés

4 *Xenopus tropicalis* appartient au sous-genre *Silurana*, c'est pourquoi l'espèce est aussi appelée *Silurana, tropicalis* (voir NCBI Taxonomy Browser).

dans un système à recyclage d'eau et ceux hébergés dans un système statique (Delpire et coll., 2011), et certaines larves de salamandre peuvent devenir cannibales en fonction des conditions environnementales, notamment la densité des congénères et l'approvisionnement alimentaire (McLean et coll., 2016). Dans un même type d'hébergement, les facteurs environnementaux suivants peuvent être une source de stress et influencer le comportement ou la physiologie de l'animal : la densité de peuplement; la présence ou l'absence de refuges; l'augmentation ou la diminution de la température de l'eau, de l'intensité lumineuse, du bruit; la présence ou l'absence d'une plateforme flottante; le type de substrat; la profondeur de l'eau et la présence ou l'absence d'un dénivelé. Pour les animaux terrestres, l'humidité est également un facteur important. En outre, la santé et le développement des individus peuvent être affectés par une infestation parasitaire, dont l'effet même peut être influencé par la densité de peuplement (Koprivnikar et coll., 2008).

La qualité de l'eau peut également affecter l'état de santé des amphibiens. Le vieillissement de l'eau est important pour le développement d'une population microbienne suffisante pour permettre le maintien du microbiome de la peau des amphibiens. L'eau âgée a une teneur réduite en chlore, mais il peut être nécessaire de la traiter si elle est encore trop chlorée pour les amphibiens. Quant à la chloramine, elle est présente même dans l'eau âgée. Les amphibiens (en particulier au stade larvaire) sont également sensibles aux métaux présents dans l'eau du réseau municipal, comme le cuivre contenu dans la tuyauterie qui est relargué dans l'eau sans être détecté par les trousses d'analyse de la qualité de l'eau. Le taux d'oxygène dissous, le pH et l'accumulation de déchets animaux sont parmi les autres éléments relatifs à la qualité de l'eau qui peuvent avoir des effets sur les amphibiens. Pour plus d'information, voir la section 3.1.3.2, « Qualité de l'eau ».

Il important de noter si les individus sont capturés à l'état sauvage ou élevés en captivité, car il existe des différences dans la manière dont les animaux s'acclimatent à une nouvelle situation. Par exemple, les animaux élevés en captivité et hébergés en groupe sont moins susceptibles de manifester de l'agressivité lorsqu'ils sont transférés dans un nouveau groupe alors que les individus capturés à l'état sauvage peuvent avoir un comportement très agressif dès qu'ils sont hébergés en groupe (Cikanek et coll., 2014). Les pratiques courantes de soins et de gestion des animaux, comme la manipulation des individus, peuvent être une source de stress pour les amphibiens. Chez certaines espèces, des manipulations pratiquées d'emblée ou répétées entraînent une réduction de l'activité locomotrice (Bliley et Woodley, 2012; Wack et coll., 2013), de l'alimentation et du poids corporel (Bliley et Woodley, 2012). Qui plus est, le temps d'acclimatation aux conditions environnementales en laboratoire peut varier selon la provenance des amphibiens sauvages.

Pour les espèces qui se camouflent pour échapper aux prédateurs, la couleur du milieu d'hébergement peut affecter leur comportement et leur physiologie. Bien que relativement peu d'études aient évalué ces effets, il apparaît que certaines espèces préfèrent une couleur de fond qui correspond à celle de leur propre corps ou qui est plus foncée (Garcia et Sih, 2003; Wente et Phillips, 2005). Selon une étude récente sur le comportement et la physiologie des *Xenopus*, l'hébergement dans un bassin au fond blanc, non pertinent au milieu écologique de l'espèce, a des répercussions négatives pour ces animaux (Holmes et coll., 2016).

2 INSTALLATIONS AQUATIQUES

Les directives générales applicables aux installations sont présentées dans les *Lignes directrices du CCPA sur : les animaleries — les caractéristiques, la conception et le développement* (CCPA, 2003a). La présente section contient des principes directeurs et des renseignements supplémentaires qui concernent spécifiquement les amphibiens.

2.1 SALLES D'HÉBERGEMENT ET SALLES D'INTERVENTION

Les salles d'hébergement des amphibiens doivent présenter les caractéristiques suivantes :

- des planchers conçus pour supporter le poids des réservoirs et des supports (Browne et coll., 2007) et inclinés pour le drainage;
- des planchers, des murs et des plafonds imperméables pour faciliter le nettoyage (Browne et coll., 2007);
- des matériaux résistants à l'humidité (Browne et coll., 2007);
- des disjoncteurs de fuite à la terre, avec des prises électriques étanches et si possible éloignées de la tuyauterie, au-dessus de la zone d'éclaboussures;
- des drains de plancher avec grille pour empêcher les animaux de s'échapper;
- des accès réservés au personnel désigné.

Une séparation adéquate entre l'unité aquatique principale des différentes espèces devrait permettre d'éviter la transmission de certains pathogènes dans l'installation (Densmore et Green, 2007).

Dans les animaleries abritant des amphibiens, il doit y avoir une salle d'eau désignée pour le lavage et la désinfection des équipements ainsi qu'une zone de quarantaine pour les nouveaux animaux et ceux qui sont malades (Browne et coll., 2007). Selon l'espèce et le but de leur hébergement, des zones désignées pour la reproduction, l'élevage des larves, l'hibernation et l'estivation sont également nécessaires (Browne et coll., 2007).

Les salles d'hébergement devraient être conçues de manière à prévenir les fuites et les intrusions d'insectes (p. ex. des déflecteurs sur les évents et les joints d'étanchéité).

Des précautions doivent être prises pour que les animaux ne puissent pas sortir des vivariums ou des aquariums (voir la section 2.2, « Vivariums et aquariums de laboratoire »). Cependant, il est recommandé de prévoir un refuge au sol pour permettre à tout amphibien qui réussit à s'échapper de s'y réfugier. Ce lieu sûr devrait contenir suffisamment d'eau pour permettre à l'animal de survivre une journée, le temps de le remettre dans son vivarium ou son aquarium.

La température et l'humidité dans les salles devraient être contrôlées, avec un système d'alarme intégré en cas de situation critique. Le taux d'humidité intérieur devrait être maintenu à environ 50 %. Contrairement à certaines autres espèces de laboratoire qui exigent un environnement constant, les amphibiens peuvent tolérer une courte période sans électricité en cas de coupure de courant. Toutefois, il devrait y avoir une alimentation électrique de secours si nécessaire afin de maintenir un environnement sain pour les animaux. En

cas d'urgence, les besoins en électricité dépendent de l'espèce et du type d'hébergement, et peuvent inclure l'alimentation de divers appareils : compresseurs d'air, chaufferettes, filtres, pompes à eau, conditionneurs d'air, humidificateurs et luminaires.

2.1.1 Approvisionnement en eau

Principe directeur 1

L'installation doit fournir aux amphibiens une eau de bonne qualité pour le maintien de leur état de santé.

Si l'eau provient d'une source municipale, on doit éliminer ou lier chimiquement le chlore et les chloramines qu'elle contient, car ces agents sont toxiques pour les amphibiens (Browne et coll., 2007). Selon les espèces, la source d'eau et le type de système d'hébergement, il peut être nécessaire d'utiliser de l'eau oxygénée (Browne et coll., 2007), et le processus d'aération de l'eau peut permettre d'éliminer les composés volatils (Browne et coll., 2007). Il est recommandé d'installer un réservoir d'eau distinct pour faciliter l'évaporation du chlore et pour disposer d'une réserve en cas d'interruption de l'alimentation en eau. Toutefois, les chloramines doivent être éliminées par l'utilisation de thiosulfate de sodium ou de filtres au charbon, car elles ne dégagent pas de gaz et ne s'évaporent pas. Dans les systèmes à grande échelle ou à débit automatique, un capteur devrait mesurer le chlore et sonner l'alarme en cas de contamination.

Si l'eau à la source contient trop de contaminants nocifs, on devrait traiter l'eau par osmose inverse ou par déionisation. La filtration au charbon est une autre option. L'osmose inverse et la distillation éliminent les oligo-éléments bénéfiques. L'eau ainsi produite contient une concentration de substances dissoutes nettement inférieure à celle des tissus cellulaires des amphibiens, ce qui peut entraîner des ballonnements et des problèmes rénaux chez les animaux (Odum et Zippel, 2011; Poole et Grow, 2012). Par conséquent, on doit ajouter des sels minéraux et d'oligo-éléments (Odum et Zippel, 2011; Poole et Grow, 2012) et laisser reposer l'eau afin de rétablir la communauté microbienne.

Les résidus dans l'eau laissés par des tuyaux de cuivre ou de plomb et les phosphates ajoutés pour prévenir ce lessivage sont toxiques pour les amphibiens (Browne et coll., 2007). Avec une tuyauterie en plastique ou d'autres produits en plastique, il y a lixiviation de composés nocifs comme le bisphénol A, le bisphénol S, les phtalates et les nonylphénols (Browne et coll., 2007). Le verre ou l'acier inoxydable devraient donc être utilisés dans la mesure du possible et, si du plastique est utilisé, il devrait s'agir de polyéthylène haute densité (PEHD) ou de plastique vieilli. Si l'eau provient du robinet, on devrait la faire couler pendant 5 à 10 minutes avant de l'utiliser pour réduire la concentration de contaminants issus de la tuyauterie.

On devrait analyser l'eau à la source pour mesurer la salinité, l'alcalinité, la dureté et le pH, ainsi que la présence de fluorures, de métaux lourds, de micro-organismes et de substances toxiques afin de s'assurer que les valeurs obtenues conviennent aux espèces hébergées. Dans le cas des espèces pour lesquelles il manque de l'information sur les qualités requises de l'eau, on devrait se renseigner sur l'eau dans leur habitat naturel. Pour connaître les consignes de surveillance continue de qualité de l'eau et les paramètres acceptables, voir la section 3.1.3.2, « Qualité de l'eau ». On devrait analyser l'eau avant l'arrivée des amphibiens.

2.2 VIVARIUMS ET AQUARIUMS DE LABORATOIRE

Principe directeur 2

La dimension et la complexité des vivariums et des aquariums doivent permettre aux amphibiens de démontrer des comportements importants pour leur bien-être.

Dans les vivariums et les aquariums, l'eau doit être douce, la température et l'éclairage contrôlés, et l'accès aux animaux configuré pour leur surveillance (Browne et coll., 2007). Ces unités devraient être conçues d'éléments sécuritaires pour les amphibiens et le personnel, et être faciles à entretenir (Browne et coll., 2007).

Chaque espèce et étape du cycle de vie exigent que certaines caractéristiques soient présentes dans les vivariums ou les aquariums pour empêcher les amphibiens d'en sortir et pour répondre à leurs besoins physiologiques et comportementaux (Browne et coll., 2007). Si les amphibiens sont nourris avec des insectes vivants, l'espace doit également être conçu pour les empêcher de s'échapper (Browne et coll., 2007).

Juste avant ou après la métamorphose, les amphibiens terrestres et semi-terrestres devraient avoir accès à un récipient d'eau assez grand pour plonger dedans ou s'y mettre à l'abri. Une plateforme doit également être prévue pour leur permettre de sortir hors de l'eau.

Les amphibiens entièrement aquatiques, comme les nectures, les axolotls, les larves d'amphibiens et certaines grenouilles adultes dont les *Xenopus*, devraient être hébergés dans des bassins d'eau déchlorée de bonne température, avec des changements d'air adéquats. Les bulleurs peuvent parfois être utilisés, mais ils sont difficiles à nettoyer et créent trop de turbulences pour certaines larves. Autrement, les pipettes Pasteur en verre connectées à des conduites d'air peuvent produire une aération plus diffuse que les bulleurs.

Le débit des filtres devrait être faible ou l'arrivée d'eau devrait être orientée ou interrompue pour permettre aux larves et aux amphibiens aquatiques de se reposer et de se déplacer sans être exposés à la turbulence de l'eau. Les axolotls supportent mal les systèmes à circulation d'eau, un faible débit d'eau devrait donc être maintenu et 5 à 10 % de l'eau devrait être remplacée à chaque jour (Khattak et coll., 2014). Les larves d'axolotl, de la naissance jusqu'à ce qu'elles atteignent 4 cm, devraient être conservées dans un système statique avec remplacement manuel de l'eau pour éviter les blessures dues à la circulation de l'eau (Khattak et coll., 2014).

Les différentes espèces d'amphibiens aquatiques devraient pouvoir se cacher et se laisser flotter. Par exemple, des tubes en polyéthylène haute densité (PEHD), entiers ou coupés en deux, peuvent servir de cachettes, et les clôtures d'hiver en plastique, de plateformes flottantes. Cependant, tout matériau de ce type ajouté à l'environnement d'un amphibien ne devrait pas avoir de bords tranchants.

Les amphibiens arboricoles ont besoin de structures pour grimper et se reposer, et d'un récipient d'eau qui leur permet de s'immerger (Forbes et coll., 2007). Les structures qui offrent la possibilité de créer des barrières visuelles entre les animaux et leur permettent de se cacher des personnes peuvent être utiles.

2.2.1 Conditions spatiales

Les trois catégories d'amphibiens suivantes doivent être hébergées dans un espace qui leur permet de démonter leurs comportements courants, voire un espace plus grand encore :

- les animaux terrestres et semi-terrestres se tiennent debout, s'allongent de tout leur long, se retournent, s'immergent dans l'eau (selon l'espèce), s'abritent et se reposent;
- les animaux aquatiques nagent, s'allongent de tout leur long, se retournent facilement, remontent à la surface et plongent au fond du bassin, s'abritent, se reposent et flottent;
- les animaux arboricoles se tiennent debout, s'allongent de tout leur long, se retournent, grimpent et se reposent.

2.2.1.1 *Xenopus*

Dans le bassin, la densité de peuplement, l'espace au fond et la profondeur de l'eau doivent favoriser la santé des animaux et permettre des comportements normaux. La superficie du fond du bassin devrait permettre à toutes les grenouilles de se tenir debout sans se toucher entre elles. Les conditions optimales pour les amphibiens *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis* sont distinctes en raison d'une différence substantielle de taille.

Tinsley (2010) note que les recommandations pour la densité chez *Xenopus laevis* adultes vont de 2 à 12 litres par animal. Selon lui, 2 litres est un espace trop étroit pour les animaux et 12 peut être peu pratique en laboratoire. D'autres publications recommandent 2,6 à 3,8 litres par animal dans un système qui recycle 10 % de l'eau par jour (Kroll Lab, 2012; University of California, Berkley, 2018; McNamara et coll., 2018). En raison de la petite taille de *Xenopus tropicalis*, on recommande 1 litre par animal (Kroll Lab, 2012; McNamara et coll., 2018). Pour les grenouilles juvéniles, McNamara et ses collègues (2018) recommendent une densité d'un *Xenopus laevis* (âgé de 8 à 12 mois) dans 1 à 2 litres d'eau, et un *Xenopus tropicalis* (âgé de 5 à 8 mois) dans 1 litre. Le sexe des animaux de même que le type et le but de l'hébergement (p. ex. l'élevage) devraient également être pris en compte. Les mâles et les femelles devraient généralement être hébergés séparément.

Pour permettre aux *Xenopus laevis* adultes de démontrer la plupart des comportements normaux, il faut une profondeur d'eau entre 20 et 30 cm (Reed, 2005; Tinsley, 2010), idéalement de 50 cm (Tinsley, 2010). Il doit y avoir un espace d'air suffisant entre la surface de l'eau et le couvercle du vivarium ou de l'aquarium pour éviter les blessures si les grenouilles sautent.

2.2.1.2 Grenouilles léopards (*Lithobates (Rana) pipiens*)

Les *Lithobates (Rana) pipiens* maintenus dans un état de torpeur hivernale simulée peuvent être gardés en assez grand nombre dans de grands bassins peu profonds dans un système à passage unique. Le niveau de l'eau doit être sous les narines des grenouilles pour éviter les noyades.

La densité ne devrait pas dépasser 20 à 30 grenouilles par m^2 de surface, selon la capacité du système à éliminer les déchets. Un bassin de 1 m^2 avec un débit d'eau entre 10 et 15 litre par minute à 4 °C peut assurer des conditions appropriées pour un maximum de 50 grenouilles si nécessaire. Les systèmes statiques et à circulation sont tous deux acceptables si les paramètres environnementaux restent stables.

2.2.1.3 Larves

La densité et l'abondance des larves devraient permettre un comportement normal et une bonne santé. Leur croissance et développement sont propres à l'espèce. Une forte densité nuit à l'élevage des larves, quoique certaines espèces peuvent être élevées dans ces conditions d'hébergement si les soins et la gestion sont appropriés (Browne et Zippel, 2007). Yagi et Green (2016) soutiennent que l'abondance des animaux (distincte de la densité) est également un facteur important. Par exemple, un nombre élevé de têtards (forte abondance) permet aux têtards de crapauds de Fowler de s'alimenter efficacement et favorise la création d'un microclimat à la température idéale; cependant, chaque têtard a également besoin de suffisamment d'espace (faible densité) pour une croissance normale (Yagi et Green, 2016).

Les individus de taille ou de taux de croissance disparate devraient être séparés sauf pour les études qui exigent une densité constante. Les variations de taille chez les têtards peuvent constituer un avantage concurrentiel pour les grands animaux et accentuer les différences du taux de croissance (Warne et coll., 2013). Par ailleurs, il y a danger de cannibalisme chez certaines espèces (p. ex. les larves de salamandres, les têtards de crapauds d'Amérique et de crapauds fouisseurs). On peut prévenir ou au moins atténuer cela en regroupant les animaux par taille ou en leur donnant de la nourriture à volonté. Par contre, les animaux doivent être séparés s'il y a des cas de cannibalisme.

2.2.2 Conception des vivariums et des aquariums

La forme du vivarium ou de l'aquarium devrait favoriser les mouvements et le comportement social naturels des amphibiens aquatiques. Les formes longues et étroites devraient être évitées, car cela limite le comportement social (Conseil de l'Europe, 2004, cité dans Reed, 2005; Forbes et coll., 2007).

Une plateforme et un niveau de l'eau qui permet aux animaux de s'immerger sont nécessaires dans les unités destinées aux amphibiens semi-aquatiques (Forbes et coll., 2007).

Pour la plupart des amphibiens, le vivarium ou l'aquarium devrait avoir des côtés sombres afin de reproduire leur environnement naturel (Forbes et coll., 2007). Pour faciliter l'observation des animaux tout en minimisant les perturbations, il peut être nécessaire d'avoir un panneau transparent sur le devant par exemple (Reed, 2005).

Pour empêcher les animaux de s'échapper, l'unité doit être recouverte d'un couvercle ou d'un filet. Les filets sont préférables, car ils permettent la circulation de l'air et l'entrée de lumière entre le vivarium ou l'aquarium et la pièce. Les grillages galvanisés ont une teneur élevée en zinc, ce qui peut poser un problème pour certaines espèces, et l'apparition de rouille sur le grillage est également une préoccupation.

2.2.2.1 *Xenopus*

Des efforts devraient être faits pour héberger les *Xenopus* dans des aquariums aux côtés sombres pour imiter leur environnement préféré (Reed, 2005; Tinsley, 2010). En effet, on a constaté que les *Xenopus* hébergés dans un milieu à fond blanc plutôt que sombre sont stressés, comme l'indiquent leur taux de corticostérone, leur comportement et leur fluctuation de poids (Holmes et coll., 2016). Il est en outre recommandé d'utiliser des aquariums à parois opaques, car les *Xenopus* sont facilement effrayés.

2.2.3 Système aquatique

Pour les amphibiens, le système de distribution de l'eau devrait être à passage unique, à recyclage ou statique avec un changement d'eau au moins deux fois par semaine (après les repas) pour aider à préserver la qualité de l'eau (Forbes et coll., 2007). Pour les amphibiens aquatiques, il est important que l'eau soit bien aérée et maintenue à une température appropriée pour l'espèce (Forbes et coll., 2007). Enfin, pour des espèces comme les *Xenopus* et les axolotls, il est important d'éviter les turbulences pour maintenir l'eau du réservoir relativement immobile (Tinsley, 2010) (c'est-à-dire que le système d'aération ne devrait pas créer une turbulence).

2.2.4 Substrat

Le type et la quantité de substrat dépendent de l'espèce, du stade de vie et du type d'hébergement. Par exemple, la plupart des crapauds ont besoin d'une couche de substrat suffisamment profonde pour s'y enfouir, et la sphaigne humide est un bon choix pour les petites salamandres (p. ex. la plupart des pléthodontidés).

Il est important que l'environnement des amphibiens soit propre mais non stérile pour favoriser leur santé, notamment un microbiome sain. Browne et ses collègues (2007) conseillent les matériaux de substrat suivants : terreau artificiel sans engrais, mousse verte, sphaigne, feuilles mortes, gravier, fibre de noix de coco moulue, grille en plastique. On doit tenir compte du fait que le substrat peut être ingéré, ce qui peut entraîner la formation de fécalomes. Les substrats à base de sciure de bois fine ou de petites particules ne devraient pas être utilisés (Forbes et coll., 2007; Browne et coll., 2007). Les vivariums ou aquariums naturalistes avec substrat bioactif peuvent être difficiles à entretenir, en particulier lorsque de nombreux animaux sont hébergés. Le papier humide semble être un substrat de choix pour les anoures et les salamandres (Pough, 2007). Toutefois, le papier utilisé devrait être inerte (p. ex. du papier filtre de laboratoire), car certains papiers peuvent contenir des acides et des agents de blanchiment nocifs pour les amphibiens dont la peau est perméable (Pough, 2007).

2.2.5 Aménagement

Chez de nombreuses espèces d'amphibiens, l'apparence est un camouflage qui les protège des prédateurs. Il est donc important de fournir à ces animaux des cachettes pour se mettre à l'abri, sans quoi ils risquent d'être stressés (Pough, 2007).

Si des éléments naturels comme le sol et les plantes peuvent paraître esthétiques pour le personnel, on ne sait pas si les amphibiens les préfèrent aux éléments artificiels (p. ex. les tuyaux et les plantes en plastique), sans compter que les premiers sont plus difficiles à nettoyer (Pough, 2007). En général, le milieu devrait être aménagé avec des éléments en plastique de qualité alimentaire et faciles à nettoyer. Tout élément artificiel ajouté ne devrait pas avoir de bords tranchants.

Pour les amphibiens semi-terrestres, on peut ajouter des pierres, des branches, des feuilles ou des morceaux d'écorce artificiels ainsi que des plateaux (Forbes et coll., 2007). Si l'aménagement comprend des matériaux naturels, ceux-ci devraient être désinfectés et inspectés régulièrement, et au besoin être remplacés afin de minimiser les risques associés aux blessures et à la charge microbiologique. Si l'aménagement comprend un bassin d'eau, il devrait être installé de manière à ce que les animaux puissent respirer et accéder facilement aux aires de repos.

Les salamandres ont besoin de structures sous lesquelles elles peuvent se cacher, comme les récipients d'eau. Ces cachettes devraient être au niveau du sol ou partiellement souterraines pour permettre aux animaux de rester en contact direct avec la paroi de la structure. Les tuyaux en PVC sont très utiles à cet effet.

Les espèces arboricoles ont besoin de structures pour grimper et se reposer (Forbes et coll., 2007).

2.2.5.1 *Xenopus*

Comme le *Xenopus* est une proie, il devrait pouvoir se réfugier dans une cachette adaptée à l'étape du cycle de vie de l'animal (Kreger, 2002), sauf si cela nuit à la qualité de l'eau. Il peut s'agir de tuyaux en plastique pour canalisations (Brown et Nixon, 2004, cité dans Reed, 2005) ou de contenant alimentaire en plastique (Schultz et Dawson, 2003, cité dans Reed, 2005). Les carreaux de céramique ou les pots en terre cuite peuvent éventuellement servir de refuges, mais on devrait d'abord évaluer si ces matériaux contiennent des agents toxiques susceptibles d'être lixiviés (Reed, 2005).

3 GESTION ET PERSONNEL DE L'INSTALLATION

3.1 GESTION DE L'ENVIRONNEMENT

Principe directeur 3

Les pratiques de gestion de l'animalerie doivent viser à faire en sorte que le milieu (la pièce et le vivarium ou l'aquarium) permet d'assurer le maintien de la santé et du bien-être des animaux et du personnel, et offre l'uniformité nécessaire à des résultats de recherche cohérents.

La manière la plus pratique et la plus efficace de fournir des conditions d'hébergement appropriées aux amphibiens dans une animalerie est d'établir des conditions environnementales générales. Après avoir déterminé les paramètres comme la durée du jour et la température idéale dans les salles, chaque vivarium ou aquarium devrait être conçu comme une unité d'hébergement individuel dans laquelle la température, la luminosité et l'humidité peuvent être ajustées pour répondre aux besoins environnementaux propres à l'espèce.

Le micro-environnement de l'hébergement devrait répondre aux besoins physiologiques des espèces, en fonction du stade de vie des animaux hébergés. Les exigences en matière de température et d'humidité varient considérablement : certaines espèces des climats nordiques ont besoin de températures froides pour l'hibernation, tandis qu'une période sèche est nécessaire pour l'estivation d'autres espèces (Browne et coll., 2007). En outre, les adultes de certaines espèces peuvent avoir besoin de conditions très différentes de celles requises pour les jeunes; par exemple, une humidité modérée pour les adultes et élevée pour les jeunes juste après le stade de métamorphose (Browne et coll., 2007).

Un équipement spécial peut être nécessaire pour maintenir un environnement approprié pour les amphibiens. Par exemple, un réfrigérateur de qualité pharmaceutique branché à une source d'alimentation électrique de secours peut être nécessaire pour le maintien des animaux en hiver, ou un humidificateur dont le filtre est changé régulièrement pour maintenir un taux d'humidité élevé tout en empêchant la croissance des algues noires.

Des mesures d'intervention rapide en cas de pannes de courant doivent être appliquées pour assurer le maintien des environnements appropriés en fonction des amphibiens hébergés.

3.1.1 Éclairage

Il existe divers systèmes d'éclairage artificiel pour l'hébergement des amphibiens, mais on manque d'information sur les effets des différentes distributions spectrales chez les amphibiens (Pough, 2007). Avec un couvercle grillagé en aluminium ou en fibre de verre recouvert de vinyle, les animaux sont directement exposés à la lumière. Une grille à larges mailles offre une meilleure transmission de la lumière, mais on doit s'assurer que les animaux et les proies ne peuvent pas s'échapper (Browne et coll., 2007).

Le spectre et l'intensité de l'éclairage doivent soutenir adéquatement la bonne santé et le comportement normal des animaux. Des données révèlent que le rayonnement ultraviolet et l'apport alimentaire en vitamine D_3 contribuent à l'amélioration de la santé, de la reproduction et de l'immunité de certains amphibiens (Antwis et Browne, 2009; Ferrie et coll., 2014; Verschooren et coll., 2011). Les avantages semblent varier en fonction de l'espèce et de son habitat naturel. Chez certaines espèces, une exposition excessive au rayonnement ultraviolet ou l'absence d'abri nuit à la peau et aux yeux (Ferrie et coll., 2014). Les rayons UVB ne sont pas nécessaires et peuvent même nuire aux axolotls et autres espèces d'amphibiens couramment utilisées en laboratoire. L'utilisation de rayons UVB pour un modèle animal devrait être justifiée (éclairage par défaut sans, car la plupart des amphibiens n'en ont pas besoin). On devrait envisager l'éclairage à rayons UVB ou des suppléments alimentaires si les animaux ont des problèmes de santé liés au développement du squelette.

La photopériode influence les cycles de reproduction des amphibiens et le moment où a lieu la métamorphose (Pough, 2007). Pour les animaux faisant partie des programmes de reproduction, la photopériode devrait donc correspondre à celle de leur milieu naturel (Browne et coll., 2007). Mis à part les exigences liées à la reproduction ou à des conditions expérimentales approuvées par un comité de protection des animaux, on devrait éviter de modifier la photopériode.

Les *Xenopus* devraient être hébergés dans une salle avec un cycle jour/nuit de 12/12 (Reed, 2005; Schultz et Dawson, 2003; Green, 2010). Il est recommandé d'augmenter et de diminuer progressivement l'éclairage pour maximiser le succès de la reproduction et la fécondité (Reed, 2005; Schultz et Dawson, 2003; Green, 2010) et pour éviter d'effrayer les grenouilles. On peut programmer une lampe pour qu'elle s'allume avant l'éclairage de la salle et reste allumée un certain temps après l'extinction des feux, mais cela n'est pas nécessaire pour les axolotls qui ne semblent pas être effrayés par des changements brusques dans l'éclairage.

Pour les espèces nocturnes, un éclairage de faible intensité devrait être assuré pendant la phase d'obscurité pour permettre la détection des proies (Pough, 2007).

Les pièces abritant des espèces fossiles devraient avoir le même éclairage que celles destinées à d'autres amphibiens, mais les animaux doivent pouvoir creuser pour se mettre à l'ombre.

3.1.2 Température et humidité relative

3.1.2.1 Température

La température devrait être déterminée en fonction des besoins des espèces hébergées. La température optimale varie considérablement d'une espèce à l'autre et au sein d'une même espèce, et en fonction de l'état de l'animal ou de son activité (torpeur, accouplement, alimentation, digestion).

Dans un contexte d'habitat naturel, les amphibiens contrôlent leur température corporelle en se déplaçant vers un environnement thermique pertinent (Kreger, 2002). En laboratoire, il est souvent utile de prévoir des gradients de température dans le vivarium ou l'aquarium pour permettre ce comportement (Reed, 2005).

La température de l'habitat naturel de l'espèce est un bon point de départ pour déterminer la température idéale du laboratoire (Pough, 2007). Le tableau 1 indique les températures recommandées par Wright et Whitaker (2001). D'après Pough (2007), l'augmentation progressive de la température en fonction du comportement et de l'état de l'animal (voir le tableau 2) est moins risquée que de passer de plus chaud à plus froid. L'inactivité, le jeûne et la constipation sont des indices qui pointent vers la nécessité d'une augmentation progressive de la température (Pough, 2007). Une peau d'apparence sombre indique également que la température est trop froide (Pough, 2007).

Tableau 1 Température idéale selon les divers groupes d'amphibiens

AMPHIBIENS	CLIMAT	TEMPÉRATURE (°C)
Anoures	Tempéré	16 à 24
	Tropical de plaine	22 à 28
	Tropical de plateau	18 à 23
Salamandres		16 à 20
Céciliens		25 à 28

Tableau 2 Température de départ avec une augmentation graduelle en fonction des réactions des animaux

HABITAT NATUREL	TEMPÉRATURE DE DÉPART (°C)
Milieu aquatique froid	10
Régions tropicales de montagne à climat tempéré froid	15
Régions tropicales à climat tempéré chaud	20 à 25

Les changements saisonniers de température et d'humidité, rapides (en quelques jours seulement) ou non, sont essentiels à la maturation des ovaires et des testicules chez certaines espèces. Les programmes d'élevage en captivité devraient reproduire les cycles saisonniers propres à chaque espèce, avec des changements de même ampleur que ceux observés dans l'habitat naturel de l'animal (Browne et Zippel, 2007).

Les variations saisonnières affectent l'activité de certaines espèces (hibernation ou estivation). Des grenouilles de régions nordiques ont été maintenues dans un état de torpeur hivernale simulée en laboratoire afin d'éliminer la prise de nourriture étant donné qu'elles s'alimentent de proies capturées en mouvement. Cette approche doit être justifiée, car elle ne tient pas compte du bien-être des animaux et peut entraîner de mauvais résultats lors de procédures expérimentales ultérieures (Tinsley, 2010).

Les grenouilles capturées dans la nature au printemps après une période de torpeur commencent à acquérir la maturité sexuelle alors qu'elles ont épuisé leurs réserves de gras corporel. Elles ne survivent généralement pas à une prolongation de cette période de froid et de privation de nourriture.

La dessiccation peut constituer un problème sérieux lors de la simulation de la torpeur hivernale chez les amphibiens, car les appareils de refroidissement éliminent efficacement la majeure partie de la vapeur d'eau ambiante. Pour compenser, il faut maintenir le substrat humide dans le vivarium ou l'aquarium. Une bouteille en verre à large ouverture avec un couvercle perforé pour une circulation d'air limitée est idéale pour simuler les conditions de torpeur hivernale. Des morceaux de buvard humides dans le fond d'une bouteille placée

au-dessus de l'animal ajoutent de l'humidité. Le milieu devrait être continuellement plongé dans l'obscurité, à une température entre 1 et 4 °C.

Les grenouilles léopards capturées à l'automne peuvent être maintenues dans un état proche de la torpeur, sans nourriture pendant quatre à cinq mois. Pour ce faire, il est nécessaire de reproduire des conditions de faible luminosité comparables à celles au fond d'un étang gelé recouvert de neige, et des journées de 8 à 9 heures. L'augmentation de la longueur du jour ou le réchauffement de la température déclenchent la maturité sexuelle, l'activité et les besoins alimentaires des grenouilles.

3.1.2.1.1 Xenopus

La température idéale pour *Xenopus laevis* est de 18 à 22 °C (Reed, 2005; Tinsley, 2010). La température ambiante devrait être entre 16 °C et 24 °C (Reed, 2005; Green, 2010), et être stable. On devrait éviter les changements brusques de température (c'est-à-dire en quelques heures), de l'air ou de l'eau (Reed, 2005). Des changements plus importants que ceux auxquels les animaux sont exposés dans leur habitat naturel (5 °C en l'espace de 2 à 5 jours) peuvent entraîner un choc thermique (Tinsley, 2010).

Quant à *Xenopus tropicalis*, qui provient de régions chaudes, il devrait être hébergé à une température entre 24 et 25 °C, car les adultes ne supportent pas bien une température inférieure à 22 °C (Green, 2010). Le développement des têtards dépend de la température; l'eau à 27 °C favorise leur croissance (Kashiwagi et coll., 2010).

Si la température de l'eau est inférieure aux recommandations, le *Xenopus* peut cesser de manger et cela peut affecter son métabolisme et son système immunitaire (Reed, 2005). Une température supérieure à 30 °C est mortelle chez *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis* (Green, 2010).

En l'absence de refroidisseur ou de réchauffeur, il est important de surveiller la température de la pièce. Celle-ci ne devrait pas fluctuer de plus de 6 °C sur une période de 24 heures (Green, 2010).

3.1.2.1.2 Axolotls

Pour les axolotls, la température de l'eau devrait être comprise entre 16 et 21 °C. Hébergés à une température inférieure, ils cessent de manger et leur métabolisme et leur système immunitaire sont affaiblis.

3.1.2.1.3 Larves de salamandres

Pour l'élevage d'espèces indigènes de larves de salamandres au Canada, la température de l'eau généralement indiquée se situe entre 10 et 12 °C et, pour la plupart des espèces de têtards, entre 18 et 22 °C. Il est cependant important d'identifier correctement les animaux et de déterminer leurs besoins, car certaines espèces ou populations font exception à cette règle.

3.1.2.2 Humidité

Les conditions d'humidité requises varient selon les espèces. Certains amphibiens, notamment les espèces provenant de milieux humides (comme les forêts tropicales humides) et celles de petite taille, ont besoin de taux d'humidité presque saturé. La circulation de l'air dans les vivariums et les aquariums destinés à ces animaux devrait permettre de pratiquement saturer l'air, et l'humidité relative devrait faire l'objet d'un suivi

régulier. Cependant, l'évaporation à travers la peau est plus faible chez d'autres espèces qui tolèrent un taux d'humidité inférieur (Withers et coll., 1984).

Les exigences en matière d'humidité devraient être examinées au cas par cas. Lorsqu'un taux d'humidité élevé est requis, les méthodes suivantes peuvent être utiles :

- ajouter un couvercle en papier poreux sur les orifices de ventilation pour réduire le taux de changement d'air et aider à la régulation de l'humidité;
- ajouter un récipient rempli de mousse de tourbe humide dans l'unité;
- suspendre une bande étroite de papier absorbant à l'intérieur de l'unité de telle sorte qu'une extrémité trempe dans un plat d'eau;
- utiliser un brumisateur à ultrasons à l'extérieur de l'unité.

3.1.3 Qualité de l'air et de l'eau

3.1.3.1 Qualité de l'air

La circulation de l'air dans la pièce doit être suffisante pour permettre aux surfaces de sécher et aux amphibiens de respirer par la peau (laisse entrer l'oxygène, et évacuer le dioxyde de carbone). Le renouvellement optimal de l'air dépend de la température et de l'humidité de l'air dans la pièce, des besoins de l'espèce et de la possibilité pour les animaux de se créer un microenvironnement. Un échange d'air rapide peut faire baisser le taux d'humidité et causer la déshydratation chez les amphibiens, tandis qu'un échange d'air faible peut l'augmenter et favoriser la condensation, la corrosion des métaux et la prolifération et la contamination microbienne.

Dans les salles d'hébergement pour espèces aquatiques, un taux entre 12 et 15 changements d'air à l'heure, comme recommandé par les fabricants d'équipements pour les habitats aquatiques, devrait être établi comme point de départ et faire l'objet d'un suivi. Dans les salles d'hébergement pour espèces terrestres, le taux de renouvellement d'air n'a pas besoin d'être aussi élevé que dans celles destinées aux espèces aquatiques. Comme les agents pathogènes peuvent se transmettre par aérosol sur une distance de quelques mètres, tout animal malade doit être séparé des autres animaux et gardé hors du périmètre précité.

3.1.3.2 Qualité de l'eau

Principe directeur 4

On doit mesurer régulièrement la qualité de l'eau.

La qualité de l'eau est très importante pour la santé des animaux aquatiques. La surveillance de la qualité de l'eau doit cadrer avec la capacité du système de maintien du milieu de vie. Elle devrait être effectuée à une fréquence déterminée d'après le respect de pratiques d'élevage adéquates afin de garantir une bonne qualité de l'eau pour les animaux hébergés. L'eau devrait être remplacée pour en assurer la qualité et tenir compte des besoins des animaux, notamment le développement et le maintien du microbiome cutané.

Pour l'hébergement des amphibiens, il est important que l'eau soit exempte de chlore et de chloramine. Le chlore endommage la couche de mucus qui protège la peau des amphibiens, notamment celle des grenouilles

et des axolotls, ce qui peut les prédisposer aux infections (Reed, 2005). Le chlore et les métaux (comme le cuivre utilisé pour la tuyauterie) peuvent contaminer l'eau et sont toxiques pour certaines espèces, à certaines étapes du cycle de vie.

Les principaux paramètres de l'eau à mesurer quotidiennement sont la température, le pH, la conductivité et la salinité. La mesure de la conductivité et de la salinité est essentielle, car les espèces aquatiques ne peuvent pas survivre dans une eau traitée par osmose inverse non reconstituée.

Lors de l'installation du système, la surveillance fréquente des taux d'ammoniac, de nitrites, de nitrates et d'oxygène dissous dans l'eau est particulièrement de mise. Cette surveillance devrait cadrer avec la capacité du système de maintien du milieu de vie, et être effectuée au moins deux fois par semaine. Dès que le système est stable, une fois par semaine peut suffire, voire une fois par mois, selon le taux de renouvellement de l'eau, sauf modification le concernant, forte augmentation de la densité des amphibiens ou détection d'un problème. S'il y a un problème de santé, une augmentation de la densité ou un problème avec l'équipement, on devrait effectuer un contrôle quotidien de la qualité de l'eau (Green, 2010), et mesurer en particulier l'alcalinité ainsi que les taux de nitrites, de nitrates et d'ammoniac. Si les amphibiens sont hébergés dans un environnement à une température et un taux d'humidité contrôlés, il n'est pas nécessaire de surveiller la température de l'eau aussi fréquemment que dans une pièce sans contrôle environnemental.

Les paramètres de la qualité de l'eau pour les amphibiens établis par Wright et Whitaker (2001) sont énumérés dans le tableau 3. Les valeurs générales fournies et les conditions varient en fonction de l'espèce, de l'étape du cycle de vie et du lieu d'origine des amphibiens. Les écarts par rapport à ces valeurs générales devraient être justifiés, avec référence à l'appui.

Tableau 3 Étendue des valeurs acceptables pour la qualité de l'eau

PARAMÈTRES	VALEURS
pH	6,5 à 8,5
salinité	0 à 5 ppt
dureté	75 à 150 mg/l[5]
alcalinité	15 à 50 mg/1[5]
oxygène dissous	>80 % saturation
dioxyde de carbone	<5 mg/l
ammoniac non ionisé	<0,02 mg/l
nitrites	<1 mg/l
nitrates	<50 mg/l
chlore	<0,01 mg/l[6]

5 On devrait consulter l'information mentionnée ici sur la dureté et l'alcalinité de l'eau pour les *Xenopus*, car des valeurs différentes sont indiquées dans certaines études.

6 La méthode utilisée doit permettre de détecter le chlore à des concentrations inférieures à 0,01 mg/l.

3.1.3.2.1 Xenopus

Green (2010) et Sanders (2004, cité dans Reed, 2005) présentent des paramètres de qualité de l'eau pour la grenouille *Xenopus laevis*. La plupart sont similaires à ceux énumérés pour les amphibiens en général (voir le tableau 3), mais les recommandations concernant la dureté diffèrent, soit entre 175 et 300 mg/l selon Green (2010) et entre 75 et 150 mg/l selon Sanders (voir le tableau 3). Quant à l'alcalinité ($CaCO_3$) recommandée par ces deux auteurs, elle se situe entre 50 et 200 mg/l, soit une valeur supérieure à celle indiquée dans le tableau 3.

3.1.3.2.2 Axolotls

L'eau du réseau municipal doit être traitée pour éliminer le chlore et les chloramines, et pour être exempte d'ammoniac, de produits chimiques et de métaux lourds (Duhon, 2019). Il est important d'utiliser de l'eau dure, car les sels sont nécessaires à la santé de la peau des axolotls et à la prévention des infections (Duhon, 2019). Autrement, on peut utiliser la solution de Holtfreter ou celle de Steinberg (Armstrong et Malacinski, 1989).

3.1.4 Sons et vibrations

Comme indiqué dans la section 1, « Introduction », les amphibiens sont capables d'entendre des sons entre 10 Hz et 10 kHz (Heffner et Heffner, 2007; Capshaw et Soares, 2016), alors que l'oreille humaine est sensible aux sons entre 20 Hz et 20 kHz. Chez les mammifères, une exposition chronique au bruit de 85 dB ou plus a des effets négatifs sur le bien-être. Quelques études chez les amphibiens ont porté sur le bruit d'origine humaine et des effets négatifs ont été notés pour 70 et 87 dB, notamment un taux élevé de corticostérone (Tennessen et coll., 2014; Troïanowski et coll., 2017). En général, le bruit ambiant en milieu naturel (forêts et champs à l'écart des zones urbanisées et des routes) est plus faible (entre 45 et 60 dB).

Les études sur les effets des sons et des vibrations sur les amphibiens, tant sur le terrain qu'en laboratoire, semblent indiquées que les bruits excessifs entraînent une inhibition de la reproduction, une vigilance accrue et une augmentation de la concentration des hormones du stress (Morgan et Tromborg, 2007). Cependant, les effets peuvent être spécifiques à chaque espèce et la recherche dans ce domaine demeure limitée (Simmons et Narins, 2018). De plus, on devrait noter que les sons se propagent plus vite dans l'eau que dans l'air, ce qui peut avoir d'autres répercussions pour les amphibiens aquatiques.

Les vibrations dans l'animalerie devraient être mesurées (en particulier lors de rénovations) et considérées comme une préoccupation négative pour le bien-être. À l'intérieur des bassins, des mesures comme l'isolation des filtres vibrants du réservoir devraient être envisagées. Pour pallier les sources de vibration externes, on peut placer des coussinets en caoutchouc sous les bassins ou installer les supports dans des seaux de sable.

3.2 LUTTE CONTRE LES ORGANISMES NUISIBLES

Des renseignements généraux sur la lutte contre les organismes nuisibles sont fournis dans les *Lignes directrices du CCPA : les soins et la gestion des animaux en science* (CCPA, 2017); et pour de l'information sur la désinfection des vivariums et des aquariums pour les amphibiens, voir également la section 6.7, « Nettoyage et désinfection ». Il est important de stocker correctement la nourriture des amphibiens pour éviter la présence de parasites et de vermines.

La lutte contre les insectes nuisibles dans les installations hébergeant des amphibiens devrait utiliser des méthodes physiques et sans produits chimiques. Les amphibiens sont très sensibles aux insecticides, et toute infestation dans le vivarium ou l'aquarium devrait être traitée avec des méthodes physiques comme le recours à des pièges en papier collant placé hors de portée des animaux.

Des précautions extrêmes doivent être prises lors de l'utilisation d'insecticides pour éviter d'exposer des insectes que les amphibiens pourraient consommer.

3.3 PERSONNEL

Principe directeur 5

Chaque amphibien doit faire l'objet d'une observation quotidienne effectuée par une personne qualifiée et, autant que possible, sans déranger l'animal.

Un effectif approprié est nécessaire pour le nettoyage des vivariums et des aquariums, la distribution de nourriture et d'eau ainsi que la gestion de tous les autres soins et pour l'observation quotidienne des animaux. Les amphibiens doivent faire l'objet d'un suivi par un personnel compétent qui peut déceler les problèmes liés au bien-être ou à la santé chez ces animaux et les résoudre au moyen des procédures normalisées de fonctionnement en vigueur, et qui assure la bonne tenue de registres et la production de rapports pour informer l'administration, l'équipe de soins vétérinaires et les chercheurs de tout changement (voir les *Lignes directrices du CCPA : les soins et la gestion des animaux en science* (CCPA, 2017)). La fréquence du suivi devrait être décrite dans les procédures normalisées de fonctionnement propre à l'espèce, tout en tenant compte des changements saisonniers comme l'hibernation.

Chez les espèces qui se cachent, le dérangement causé par le fait de déterrer les animaux ou d'enlever le couvercle du vivarium ou de l'aquarium pour mieux observer doit tenir compte des questions de santé. Toutefois, tous les systèmes de maintien du milieu de vie des animaux (hébergement et microenvironnement) ainsi que les conditions du macroenvironnement doivent être vérifiés tous les jours, et idéalement munis d'une alarme pour signaler toute défaillance au personnel responsable des soins aux animaux afin d'éviter de causer le stress ou la mort des animaux.

L'ensemble du personnel devrait appliquer les bonnes pratiques respectueuses du bien-être des animaux (p. ex. ne pas taper sur les bassins et les déplacer de manière à perturber le moins possible les animaux). Les listes de vérification facilitent l'observation cohérente et objective des animaux effectuée au fil du temps par différentes personnes. Ces listes devraient être conservées dans la pièce où se trouvent les animaux.

En présence de problèmes de bien-être animal, il est nécessaire de tenir compte et de s'assurer de la disponibilité du personnel pour mettre en œuvre les stratégies d'atténuation appropriées.

4 ACQUISITION

4.1 SOURCE

Pour des raisons à la fois de santé et de bien-être des animaux et de qualité scientifique, les amphibiens devraient être issus d'une colonie élevée en captivité à des fins scientifiques. Ces animaux ont un cycle biologique, un âge et un régime alimentaire connus, et le risque d'introduction de maladies ou de parasites indésirables dans une colonie déjà présente peut être réduit. Ils ont également été élevés dans des conditions artificielles d'hébergement, de soins et de gestion et nécessitent donc moins d'acclimatation à l'environnement en laboratoire que les animaux capturés à l'état sauvage. Par exemple, on a constaté que les *Xenopus* élevés en laboratoire s'habituent aux personnes qui se déplacent dans la pièce et ne réagissent pas aux bruits forts soudains ou aux pratiques de soins et de gestion (Conseil de l'Europe, 2003). En outre, la capture d'animaux affecte l'écosystème de provenance.

Des amphibiens capturés à l'état sauvage peuvent être nécessaires pour certaines études. Par exemple, la meilleure fécondité du *Xenopus* sauvage par rapport à celle de congénères élevés en laboratoire permet d'utiliser moins d'animaux pour obtenir la quantité de matériel biologique requise (Conseil de l'Europe, 2003) ou pour maintenir la diversité génétique dans une colonie (Reed, 2005). Voir la section 4.2, « Lois et règlements », pour connaître les règlements concernant les amphibiens capturés à l'état sauvage.

4.2 LOIS ET RÈGLEMENTS

Principe directeur 6

Les installations et les chercheurs doivent connaître et respecter les lois et politiques internationales, fédérales et provinciales ou territoriales qui s'appliquent pour l'acquisition, le transport et l'utilisation des amphibiens à des fins de recherche.

En plus des règlements provinciaux et territoriaux, les chercheurs ont besoin de respecter les autres règlements et d'obtenir les autorisations applicables. Par exemple, un permis de la Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction (CITES) peut être exigé si l'état d'une population est préoccupant, et pour les exigences relatives au contrôle des agents pathogènes, l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) est le point de contact.

Les exigences pour les espèces inscrites aux annexes de la CITES sont disponibles sur le site d'Environnement et Changement climatique Canada. Le système automatisé de référence à l'importation (SARI) de l'ACIA est une ressource utile pour déterminer les exigences d'importation pour les animaux.

Il faut un permis délivré par le ministre de l'Environnement du Canada pour importer tout spécimen appartenant à l'ordre des Caudata (qui englobe les salamandres, les tritons et les nectures); voir la *Politique de délivrance de permis sur les salamandres*).

Si la capture d'amphibiens sauvages n'est pas réglementée par la province ou le territoire, les comités de protection des animaux devraient en évaluer les effets et s'assurer que des mesures pour les réduire sont décrites dans les protocoles, comme le nettoyage du matériel utilisé dans plusieurs sites et le prélèvement de seulement une partie des masses d'œufs sur ces sites (voir la section 5.4, « Œufs »).

4.3 PRÉPARATION DU TRANSPORT

Principe directeur 7

Avant le départ, le fournisseur et le destinataire doivent s'entretenir au sujet du transport, du bien-être et des soins des amphibiens.

Les documents de santé doivent être fournis conformément à la réglementation régissant le mouvement des animaux. Consulter l'Agence canadienne d'inspection des aliments pour connaître les exigences en matière de documentation. Pour le transport aérien international, l'Association du transport aérien international (IATA) exige que les expéditeurs confirment par écrit que les animaux sont en santé. Il est important d'avoir tous les documents requis pour éviter tout retard dans le transport des animaux.

Tous les documents disponibles sur la santé des animaux, sur les conditions dans lesquelles ils ont été hébergés auparavant (entre autres, la température, l'humidité, la nourriture, les pratiques de soins et de gestion, l'enrichissement), sur leurs besoins particuliers ainsi que sur les conditions de transport peuvent aider à répondre aux besoins des animaux pendant le transport, notamment en cas d'une interruption du transport, et dès leur arrivée.

4.4 TRANSPORT

Les amphibiens devraient être transportés pendant les saisons où les températures sont modérées par rapport à leur habitat naturel. Pour le transport en hiver ou en été, des précautions doivent être prises pour maintenir la température idéale pour l'espèce dans le conteneur, par exemple en ajoutant un sachet réfrigérant ou chauffant dans un contenant secondaire (Reed, 2005). Le transport devrait être retardé si des conditions climatiques extrêmes sont défavorables au bien-être des animaux (Reed, 2005).

L'itinéraire devrait être d'une durée la plus courte pratiquement possible. On devrait prévoir les délais possibles et planifier le transport pour protéger le bien-être des animaux en cas de retard.

En ce qui concerne le transport aérien des amphibiens, les recommandations de l'IATA doivent être respectées. L'Association fournit également des règles utiles dans le cas du transport terrestre.

Les amphibiens devraient être transportés dans deux contenants distincts, soit un contenant primaire (pour l'hébergement et le confinement) qui est ensuite placé en sécurité à l'intérieur d'un contenant secondaire rigide. Les couvercles ou les ouvertures des contenants primaires doivent être fermés et scellés. On peut ajouter du papier journal ou de la mousse pour soutenir le premier contenant dans le second et éviter les vibrations pendant le transport. Les contenants primaires doivent être gardés à l'abri de la lumière directe du soleil et à température idéale pour l'espèce transportée.

Le contenant primaire doit être fabriqué dans un matériau résistant à l'eau qui ne se dégrade pas s'il est mouillé, car les amphibiens ont besoin d'être conservés à l'humidité. Lorsque des sacs en tissu sont utilisés pour cela, ils doivent être gardés humides; lorsque des caisses en plastique sont utilisées, on doit y ajouter un substrat humide. Le contenant primaire doit être bien alimenté en air. Par ailleurs, on doit veiller à ce que le poids du sac ou du substrat humide n'étouffe pas l'animal et qu'il n'y a aucun objet mobile à l'intérieur du contenant qui peut nuire à l'animal. Certains amphibiens peuvent être transportés dans un sac plastique scellé, contenant de l'eau et rempli d'air. Le sac doit être suffisamment solide et placé dans un contenant secondaire sans objet pointu qui pourrait perforer le sac.

Les sacs en tissu humide qui sont utilisés comme premier contenant ne doivent pas être faits d'un matériau abrasif comme la toile de jute. Si des caisses en plastique ou en mousse de polystyrène sont utilisées, elles doivent être neuves ou bien lavées, rincées et séchées à l'air libre avant d'être réutilisées. Pour la ventilation, il faut de petits trous (de 3 à 6 mm) sur les côtés et le dessus des caisses. Les trous devraient être faits par l'intérieur pour éviter de créer des bords tranchants qui peuvent causer des lésions chez les animaux. Le contenant devrait être rembourré avec un substrat afin de réduire les lésions traumatiques et de fournir une source d'eau à l'animal pendant le transport. Toutefois, on doit éviter les substrats abrasifs qui risquent d'endommager la peau sensible des amphibiens. Un matériau inerte légèrement humidifié et que l'on peut écarter pour créer des espaces d'air et des refuges pour les animaux est une bonne solution d'emballage. Pour éviter d'écraser, de piéger ou de noyer les animaux, le matériau d'emballage ne doit pas être saturé d'eau. Une éponge humide, en morceaux, est un matériau de substrat approprié. On ne devrait pas utiliser de papier essuie-tout humidifié qui est inefficace comme matériau de bourrage.

Le format de l'emballage de transport dépend de la taille et du degré d'activité de l'amphibien. Les anoures ont tendance à sauter et à se blesser en heurtant le contenant pendant le transport. Pour éviter les blessures, on devrait restreindre leur mobilité en limitant la hauteur libre dans le contenant primaire.

Afin de prévenir le cannibalisme, l'agressivité entre espèces différentes et les effets toxiques entre certaines espèces, les animaux de différentes tailles (petits ou moyens) et les espèces ne devraient pas être mélangés dans un même contenant.

Quelle que soit la taille des amphibiens, leur habitat naturel ou le nombre d'animaux transportés ensemble, le premier contenant doit toujours être suffisamment grand pour permettre à tous les animaux de s'aplatir au sol, face ventrale au fond du contenant. Les recommandations suivantes devraient également être respectées pour déterminer la taille des contenants :

- les amphibiens de grande taille (anoures dont le corps mesure plus de 15 cm et les autres amphibiens dont la longueur totale dépasse 30 cm) devraient être transportés individuellement dans un contenant primaire d'au moins 5 litres; tout sac en tissu devrait mesurer au moins 30 x 45 cm;
- les amphibiens de taille moyenne (anoures dont le corps mesure de 6 à 15 cm et les autres amphibiens dont la longueur totale est entre 15 et 30 cm) peuvent être transportés en groupe jusqu'à concurrence de 20 animaux par contenant; chaque animal devrait avoir un espace minimal de 250 ml et tout sac en tissu devrait mesurer au moins 30 x 45 cm;
- les amphibiens de petite taille (anoures dont le corps mesure de 3 à 6 cm et les autres amphibiens dont la longueur totale est entre 6 et 15 cm) peuvent être transportés en groupe jusqu'à concurrence de 40 animaux par contenant; chaque animal devrait avoir un espace minimal de 100 ml et tout sac en tissu devrait mesurer au moins 30 x 45 cm;

- les amphibiens de très petite taille (anoures dont le corps mesure moins de 3 cm et les autres amphibiens dont la longueur totale est inférieure à 6 cm) peuvent être transportés en groupe jusqu'à concurrence de 50 animaux par contenant; chaque animal devrait avoir un espace minimal de 50 ml et les sacs en tissu ne sont pas indiqués.

Les larves d'amphibiens doivent être transportées dans une eau suffisamment aérée. Il peut s'agir de sacs remplis d'eau et d'air dans des proportions déterminées par les besoins des animaux et tenant compte du risque d'éclaboussures nuisibles aux animaux.

Les contenants secondaires isolés avec de la mousse (une boîte en mousse de polystyrène placée dans une boîte en carton) sont recommandés pour prévenir les changements soudains de température et pour protéger contre les températures extrêmes. Cependant, comme le polystyrène est poreux et ne retient pas l'eau, il faut absolument s'assurer de l'étanchéité des sacs en plastique et des contenants primaires, car les fuites passent au travers de la mousse pour mouiller le carton, ce qui peut entraîner des retards dans le transport. Des boîtes en carton ou en contreplaqué, résistantes à l'eau et isolées avec de la mousse, peuvent également être utilisées. Des sachets chauffants ou réfrigérants peuvent être placés à l'intérieur de la boîte d'expédition isolée pour compenser les conditions climatiques, mais leur effet est limité et aléatoire si le contenant et les animaux sont exposés à des températures extrêmes pendant une période prolongée. Si la température est une préoccupation, des enregistreurs de données de température peuvent être placés dans le contenant de transport pour détecter si les animaux ont été soumis à un stress dû à la température.

Si des espèces particulièrement toxiques (p. ex. les *Rana palustris* ou grenouilles des marais et les *Taricha*) sont transportées, des mesures doivent être prises pour maintenir la qualité de l'eau, par exemple en changeant l'eau si les animaux sont gardés longtemps dans le contenant.

4.4.1 *Xenopus*

Le transport et l'arrivée dans un nouvel hébergement sont stressants pour les *Xenopus* et peuvent entraîner une augmentation de la corticostérone et une diminution de la masse corporelle pendant une période pouvant aller jusqu'à 35 jours (Holmes et coll., 2018). La chaleur excessive est une préoccupation importante pendant le transport; les températures supérieures à 25 °C peuvent entraîner la désintégration des cellules de la peau et endommager les œufs des femelles (Reed, 2005).

La sphaigne et les cubes de mousse sont des substrats utilisés pour le transport. En général, la sphaigne convient au transport même si elle peut être abrasive (Holmes et coll., 2018) ou infestée par des acariens (Ford et coll., 2004).

4.4.2 Larves

Green (2010) suggère de transporter les larves de *Xenopus* dans des sacs remplis d'air et d'eau dans une proportion de 2/3 et 1/3.

Les petits axolotls (2 à 3 cm) peuvent être gardés en santé avec un faible risque de blessures en cas d'éclaboussements lorsqu'ils sont transportés dans des sacs contenant 90 % d'eau et 10 % d'air à une température entre 15 et 16 °C.

4.5 RÉCEPTION DES AMPHIBIENS

Les unités dans lesquelles les amphibiens sont transférés à la réception devraient être vérifiées au préalable pour s'assurer que la température de l'eau et les paramètres de la qualité de l'eau (p. ex. pH, conductivité, nitrates, nitrites) sont acceptables (voir la section 3.1.3.2, « Qualité de l'eau »).

Des procédures devraient être en place dans l'animalerie pour le transfert de nouveaux amphibiens dans les unités aquatiques, spécifiques aux espèces et à l'étape du cycle de vie. Ces procédures devraient préciser le nombre d'animaux à transférer dans chaque unité.

Afin de réduire le risque de propagation de maladies ou de bactéries, l'eau et tout substrat dans les contenants de transport ne devraient pas être transférés dans les nouveaux bassins (Reed, 2005). En outre, les animaux devraient être plongés dans un système statique séparé pour les rincer afin de retirer les résidus de matériaux d'emballage avant de les transférer dans leur unité. Le vétérinaire doit être consulté sur toute utilisation proposée d'antibiotiques ou d'agents antifongiques.

Principe directeur 8

La santé et le bien-être des amphibiens doivent être vérifiés à leur arrivée par des employés qualifiés en soins animaliers.

L'évaluation de la santé et du bien-être des animaux à leur arrivée devrait être décrite dans une procédure normalisée de fonctionnement. La procédure devrait inclure la vérification pour confirmer que les animaux retirés du conteneur correspondent à ceux commandés, et l'inspection visuelle de l'état des animaux. Si possible, on devrait peser et mesurer les animaux et procéder à la détection de parasites par l'analyse d'échantillons de matières fécales. Les informations reçues du fournisseur (voir la section 4.3, « Préparation du transport ») devraient être utilisées pour déterminer les procédures de quarantaine.

Les animaux reçus qui présentent des signes de maladie ou de blessures devraient être séparés des autres et évalués par un vétérinaire afin de déterminer les mesures à prendre (p. ex. surveillance, traitement ou euthanasie). Tout animal mort à l'arrivée devrait être retiré du conteneur et la carcasse devrait être examinée dès que possible.

Il est essentiel de fournir aux nouveaux amphibiens des substrats similaires à ceux auxquels ils ont été exposés auparavant. Pour les amphibiens capturés à l'état sauvage, les substrats de leur environnement naturel peuvent être désinfectés en les chauffant à plus de 70 °C pendant 20 minutes (Browne et coll., 2007).

4.6 QUARANTAINE ET ACCLIMATATION APRÈS LA RÉCEPTION DES ANIMAUX

Principe directeur 9

Les amphibiens devraient être soumis à une période de quarantaine et d'acclimatation après le transport et avant leur utilisation dans des études.

La quarantaine est importante pour prévenir la propagation d'agents pathogènes (comme la chytridiomycose) du milieu naturel vers l'animalerie, au sein de l'animalerie et de l'animalerie vers le milieu naturel (Browne et coll., 2007). La quarantaine devrait idéalement se dérouler dans une pièce séparée; si c'est impossible, des mesures doivent être prises pour éviter les éclaboussures et le transfert d'aérosols entre les vivariums et aquariums (p. ex. des rayonnages distincts). Pour protéger les animaux déjà présents, les procédures de soins et de gestion des amphibiens en quarantaine devraient être entreprises après celles destinées aux autres animaux de l'animalerie, et le matériel (y compris l'équipement de protection individuelle) doit être réservé à la zone de quarantaine (Reed, 2005). Lorsque différents groupes d'animaux sont en quarantaine, des précautions devraient être prises pour éviter la transmission d'agents pathogènes entre les groupes.

L'animalerie devrait avoir la capacité d'assurer une mise en quarantaine complète, notamment la distribution d'eau et le mouvement du personnel et de l'équipement (p. ex. les substrats pour les bassins). Les zones de quarantaine devraient être nettoyées fréquemment, et les planchers, les surfaces et les drains désinfectés.

Tous les bassins de quarantaine doivent être désinfectés après utilisation et l'eau doit être traitée. L'eau de Javel est efficace pour désinfecter les surfaces; pour la solution javellisante, la concentration et le temps pour laisser agir sont déterminés en fonction du pathogène en cause; voir par exemple les documents préparés par Poole et Grow (2012), le CDC (2017) et l'ACIA (2018). Il est important que les résidus soient éliminés par rinçage et que les surfaces soient sèches avant l'utilisation. Dans la mesure du possible, les bassins et le matériel devraient être stérilisés à l'autoclave.

Pendant la quarantaine, on devrait observer les amphibiens tous les jours pour repérer tout signe de problème de santé (Reed, 2005), comme les lésions cutanées, la pâleur, la cachexie et les habitudes alimentaires anormales (voir la section 9, « Évaluation du bien-être animal »). Les procédures de quarantaine dépendent de la provenance des amphibiens, mais tous les individus soupçonnés d'être atteints de chytridiomycose devraient être testés (Boyle et coll., 2004). L'administration des traitements devrait se faire en consultation avec un vétérinaire.

La quarantaine devrait être établie en fonction de l'espèce et des conditions environnementales et durer au moins aussi longtemps que la période prescrite par un vétérinaire. Les amphibiens sauvages devraient être mis en quarantaine pendant au moins 90 jours pour la plupart des types d'études et des pratiques de surveillance de la santé (Wright et Whitaker, 2001). La période de quarantaine pour les amphibiens élevés en captivité et dont on connaît l'état de santé est généralement plus courte (O'Rourke, 2002, cité dans Reed, 2005), selon les résultats des analyses fécales et des évaluations physiques.

Il est important de prévoir une période d'acclimatation, qui peut avoir lieu en même temps que la quarantaine, pour atténuer tout stress lié au transport et s'assurer du retour à l'état physiologique normal de l'animal. Le temps requis dépend des conditions de transport, de l'âge des animaux, des individus concernés et des études pour lesquelles ils seront utilisés. Cette période devrait servir pour habituer les animaux aux conditions environnementales (comme la distribution de la nourriture et de l'eau). Pour réduire le stress, les animaux devraient être acclimatés aux conditions et aux procédures de soins et de gestion en vue de l'expérimentation.

4.6.1 *Xenopus*

La période de quarantaine recommandée pour les *Xenopus* en captivité est d'au moins 7 à 10 jours, ou jusqu'à 30 jours. Comme les principaux parasites de *Xenopus laevis* ont un cycle de vie de 4 à 6 semaines, la quaran-

taine devrait couvrir cette même période (Sanders, 2004, cité dans Reed, 2005). Une période de 90 jours est recommandée pour les individus capturés (Reed, 2005).

Pendant la quarantaine, l'observation quotidienne des *Xenopus* comprend la recherche de signes de mauvaise santé, comme un changement d'activité physique, une décoloration de la peau, une dilatation cœlomique, une ulcération ou une hémorragie à la patte (Reed, 2005).

4.6.2 Axolotls

Les axolotls élevés en captivité devraient être mis en quarantaine pendant au moins 7 à 10 jours, ou plus longtemps selon l'avis du vétérinaire.

5 ÉLEVAGE

La reproduction varie considérablement chez les amphibiens, et l'absence de souches élevées en laboratoire est en partie due à la difficulté d'établir des conditions environnementales appropriées pour favoriser la maturité sexuelle et le comportement reproducteur. Pour de nombreux amphibiens, malgré la réussite de la reproduction, il est difficile de maîtriser l'élevage jusqu'au stade juvénile (Browne et Zippel, 2007).

Pour certaines espèces, la simulation du processus naturel de reproduction favorise l'élevage en captivité. Par exemple, la reproduction des tritons est possible sans traitement hormonal lorsqu'une température inférieure à celle à laquelle ils sont normalement hébergés est maintenue pendant 2 à 3 mois. Toutefois, des traitements hormonaux sont nécessaires pour induire la reproduction pour certaines espèces (Trudeau et coll., 2010). La reproduction tant naturelle qu'artificielle est donc importante pour la gestion à long terme des amphibiens en captivité (Browne et Zippel, 2007).

Browne et Zippel (2007) étudient les déclencheurs hormonaux et les changements nécessaires à la reproduction naturelle. Pour une reproduction fructueuse, les conditions environnementales devraient émuler celles présentes dans l'environnement naturel de l'animal, comme la température (y compris les changements de température et la température idéale pour l'hibernation et l'estivation), la nourriture et la photopériode (Browne et Zippel, 2007). Chez certaines espèces, les signaux vocaux sont également importants pour la reproduction.

L'étude de Brown et Zippel (2007) examine les injections d'hormones pour obtenir des ovocytes ou des spermatozoïdes, et présente des techniques de collecte et de conservation d'ovocytes et de spermatozoïdes viables.

5.1 ÂGE ET ÉTAT DE REPRODUCTION

Principe directeur 10

Des paramètres spécifiques associés à la santé des reproducteurs devraient être établies pour chaque espèce et être respectées avant toute tentative de reproduction.

De nombreuses espèces d'amphibiens présentent un dimorphisme sexuel. Chez les anoures par exemple, on distingue les mâles des femelles par les coussinets nuptiaux ou brosses copulatrices, callosités cornées qui se forment sur les pouces lors de la saison de reproduction, la taille et la couleur du tympan, la couleur de la gorge et du corps, et le coassement (Browne et Zippel, 2007). L'âge de maturité sexuelle et la fréquence de la reproduction varient chez les amphibiens; toutefois, les mâles sont généralement plus précoces que les femelles (Browne et Zippel, 2007) et le nombre d'œufs produits augmente avec le poids de la femelle (Reed, 2005).

5.1.1 *Xenopus*

Chez *Xenopus laevis*, la reproduction des femelles est possible entre l'âge d'un et cinq ans, avec un sommet de vie reproductive à l'âge de 2 ou 3 ans (Green, 2010). La femelle ne devrait pas être accouplée plus d'une fois tous les 1 à 3 mois avec, idéalement, une période de repos de 6 mois entre les accouplements (Green, 2010). Les mâles peuvent être accouplés jusqu'à l'âge de 3 ans à une fréquence de 2 à 3 fois par mois (Green, 2010).

Chez *Xenopus tropicalis*, les femelles peuvent se reproduire à l'âge de 6 à 9 mois, pondre tous les 4 ou 6 mois, et s'accoupler jusqu'à l'âge de 5 à 8 ans (Green, 2010). L'âge de maturité sexuelle est semblable pour les mâles reproducteurs.

Les animaux peuvent continuer à être utilisés pour la reproduction au-delà de cette période s'ils sont en bonne santé et si des œufs et des embryons de bonne qualité continuent à être produits.

5.1.2 Axolotls

Les femelles peuvent se reproduire à partir de l'âge de 12 mois, et les mâles à partir de l'âge de 9 à 12 mois (Khattak et coll., 2014; Duhon, 2019). Les femelles et les mâles peuvent être accouplés jusqu'à l'âge de 7 ou 8 ans; au-delà de cet âge, le taux de reproduction décline. Les femelles peuvent être accouplées tous les 2 mois (Khattak et coll., 2014; Duhon, 2019), mais idéalement tous les 3 mois. Les mâles devraient être accouplés toutes les 4 semaines (Khattak et coll., 2014), mais on peut augmenter la fréquence des accouplements (jusqu'à un intervalle de 1 à 2 semaines) pourvu que les animaux restent en bonne santé et productifs (Duhon, 2019).

5.2 CONSIDÉRATIONS CONCERNANT LA REPRODUCTION

Les stratégies de reproduction des amphibiens comprennent la fécondation externe et interne : typiquement externe chez les anoures, et interne chez les Céciliens et chez beaucoup de salamandres et tritons (Kupfer et coll., 2004; Kikuyama et coll., 2009). La reproduction est différente selon les espèces, vivipares ou ovipares, et certains amphibiens ont des poches dans lesquelles ils transportent les œufs et les larves. Le nombre d'œufs dépend de l'espèce ovipare. Par exemple, chez les anoures, l'espèce *Lithobates pipiens* pond environ 2500 œufs, tandis que *Lithobates catesbeianus* (grenouille-taureau) peut en pondre 20 000 (Gilbert, 2000). Les larves de la plupart des espèces sont aquatiques, mais celles des salamandres des genres *Plethodon*, *Ensatina* et *Aneides* sont terrestres, et leurs œufs, déposés dans un microenvironnement terrestre protégé et humide.

En laboratoire, les femelles et les mâles devraient être hébergés séparément avant de procéder à la reproduction. La taille, la profondeur d'eau et l'enrichissement dans le bassin de reproduction doivent être en adéquation avec l'espèce. Pour une reproduction naturelle, l'environnement doit favoriser les comportements naturels.

Quand on utilise un appareil de réfrigération ou un conditionneur d'air pour réduire la température pendant une période déterminée afin de préparer les amphibiens en vue de la reproduction, on doit veiller au maintien d'un taux d'humidité adéquat. Car en plus de refroidir l'air, le système la déshumidifie.

5.2.1 *Xenopus*

Tout comme les autres amphibiens, le mâle et la femelle *Xenopus* devraient être séparés avant l'accouplement afin d'induire la reproduction. Chez *Xenopus laevis*, on a constaté qu'une température appropriée, une eau de bonne qualité et un enrichissement sous forme d'un nénuphar artificiel ont un effet positif sur la produc-

tion d'ovocytes et d'embryons (Heyworth et Owens, 2019). Quant aux *Xenopus tropicalis*, les grenouilles adultes devraient être hébergées à une température de 22 à 24 °C pour la production d'embryons destinés à des études scientifiques; des températures supérieures ont une incidence négative sur l'amplexus et le nombre d'œufs pondus (Kashiwagi et coll., 2010).

5.2.2 Axolotls

Les axolotls adultes sont souvent hébergés individuellement avant l'accouplement; l'hébergement en groupe est possible, mais peut diminuer l'efficacité de l'accouplement (Khattak et coll., 2014). Les femelles en période de reproduction ont un ventre rond, ce qui indique la présence d'œufs, et les mâles sont musclés et en bonne santé, avec un cloaque gonflé (Khattak et coll., 2014). Les bassins d'accouplement sont maintenus à une température inférieure (entre 15 et 16 °C) à celle des bassins d'origine (entre 18 et 20 °C) (Khattak et coll., 2014).

Pour l'accouplement, le mâle et la femelle sont placés dans le bassin d'accouplement avec des feuilles de plastique ou des pierres et le débit d'eau est coupé (Khattak et coll., 2014). Des glaçons d'eau déchlorée peuvent être ajoutés à l'eau pour réduire la température à 11 ou 12 °C pendant 24 heures, ce qui stimule la production de spermatophores. Le succès d'un appariement particulier est imprévisible, mais cela devrait conduire la plupart des mâles à produire des spermatophores (Duhon, 2019).

5.3 INDUCTION DE LA REPRODUCTION EN CAPTIVITÉ

Depuis un certain temps, on utilise l'induction de la maturation sexuelle et de l'ovulation ou de l'émission de sperme chez les anoures (principalement *Xenopus laevis* et les *Lithobates*, anciennement le genre *Rana*) par injection de gonadotrophines hypophysaires de grenouille ou de gonadotrophines chorioniques de mammifère. Les avancées récentes en matière de traitement hormonal sont examinées par Trudeau et ses collègues (2010). Une fois à maturité, la reproduction est généralement induite, car ces amphibiens ne présentent pas nécessairement de comportement reproducteur. Browne et ses collègues (2001) décrivent des méthodes qui permettent de prolonger la viabilité des ovocytes en utilisant des températures basses ou des solutions salines pour augmenter l'osmolarité, puis en les stockant dans une solution de Ringer ou de DeBoer spéciale pour amphibiens.

Un protocole d'élevage particulier à l'espèce devrait être consulté pour déterminer la dose d'hormones, le niveau d'eau et le pH approprié. Quand des hormones sont injectées aux amphibiens pour provoquer la reproduction, chaque aiguille devrait être utilisée une seule fois, car sa pointe s'émousse très rapidement et peut alors blesser l'animal.

Concernant les interventions chirurgicales pour prélever des oocytes, voir la section 10.9, « Prélèvements d'oocytes ».

5.3.1 *Xenopus*

Des injections de gonadotrophines sont normalement utilisées pour déclencher la maturation des ovocytes et induire l'ovulation chez les *Xenopus* (Green, 2010; Wlizla et coll., 2017). Dans le cas d'un prélèvement d'ovules chez une femelle stimulée en caressant la cavité cœlomique inférieure, la pression appliquée ne doit pas causer de traumatisme aux muscles ou aux organes internes (Green, 2010). Les ovocytes peuvent également être prélevés par voie chirurgicale sous anesthésie générale (Green, 2010).

Pour la reproduction de *Xenopus tropicalis*, l'eau devrait avoir un pH entre 5,8 et 6,0. Les femelles reçoivent une injection de gonadotrophine et sont séparées des mâles pendant le premier jour. Le deuxième jour, les couples sont hébergés ensemble et l'accouplement devrait avoir lieu dans les 2 à 6 heures. On devrait ramasser les œufs avec un filet à mailles très fines après 3 ou 4 heures d'amplexus pour éviter qu'ils soient mangés. Les œufs devraient être transférés dans des boîtes de Petri à une densité ne dépassant pas 100 œufs par boîte. Le mâle et la femelle devraient ensuite être transférés dans des bassins séparés et être isolés jusqu'au lendemain pour surveiller leur santé et s'assurer que la femelle a fini de pondre (Showell et Conlon, 2009).

5.3.2 Axolotls

Les axolotls sains se reproduisent facilement, et les injections d'hormones ne sont généralement pas nécessaires (Duhon, 2019). Pour l'axolotl, une période de repos de deux mois devrait avoir lieu après le frai. Il se peut que des animaux ne fraient pas après un repos et que des hormones soient nécessaires. Dans ces cas, on utilise une injection de gonadotrophine, comme chez les grenouilles.

5.4 ŒUFS

Si les œufs sont capturés dans la nature, le nombre d'œufs devrait être établi en fonction de la masse d'œufs, l'abondance des masses d'œufs sur le site et les menaces écologiques. Seule une partie de chaque masse d'œufs devrait être utilisée pour réduire au minimum les répercussions sur les populations sauvages.

Si des adultes en amplexus sont capturés dans la nature afin de les faire pondre dans des contenants et de les relâcher ensuite, ces animaux doivent être remis en liberté dans leur milieu d'origine. Les animaux qui ont été amenés au laboratoire ne devraient pas être relâchés dans l'environnement naturel pour éviter la transmission de maladies.

La gangue gélatineuse des œufs fournit une défense contre la moisissure aquatique, et la décision de la retirer devrait être fondée sur l'espèce et l'environnement (Gomez-Mestre et coll., 2006). La procédure pour éliminer cette enveloppe protectrice est également particulière à l'espèce; par exemple, le traitement à la L-cystéine, efficace pour certaines espèces, ne fonctionne pas sur les œufs des axolotls. Dans certains cas, l'élimination de la gangue gélatineuse et la séparation des œufs peuvent réduire la propagation de la moisissure aux œufs sains. Les œufs ainsi traités devraient être conservés dans une solution (p. ex. la solution de Ringer pour les œufs d'espèces canadiennes ou la solution[7] FETAX (*Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus*) pour les œufs de *Xenopus*). Les soins nécessaires après l'élimination de la gangue gélatineuse dépendent de l'espèce (p. ex. pour les *Xenopus*, voir Wlizla et coll., 2018). Pour les axolotls, aucun produit chimique n'est utilisé pour enlever la gangue gélatineuse, et il n'y a pas de risque de maladie puisque les œufs ne sont pas prélevés dans la nature.

Les œufs devraient être conservés dans des conditions qui imitent leur environnement naturel en ce qui concerne entre autres la température, la luminosité (ombrage ou non) et le débit d'eau. La densité devrait être déterminée en fonction du stade de développement; par exemple, moins de 100 embryons de *Xenopus* avant les stades 35 à 36 pour une boîte de Petri de 10 cm et moins de 50 aux stades 35 à 36 pour une boîte de même taille (Wlizla et coll., 2018). On devrait vérifier les œufs tous les jours et retirer les œufs morts.

7 ASTM E1439-12 (2019) *Guide standard pour la réalisation du test de tératogenèse sur embryon de grenouille-Xenopus (FETAX)*. West Conshohocken PA: ASTM International.

5.5 SOINS DE LA PROGÉNITURE

Le taux de mortalité des jeunes amphibiens en captivité devrait être plus faible que dans la nature. Les deux étapes suivantes présentent toutefois un risque de mortalité particulièrement élevé, et ce, même en captivité, soit l'éclosion des œufs et la transition de la forme d'une larve à la forme adulte. Pour une progéniture en bonne santé, il est important de retirer les embryons morts et d'assurer un suivi quotidien. Les animaux devraient également être surveillés de près pour anticiper leurs besoins changeants et y répondre, comme le type et la quantité de nourriture et le système d'hébergement requis pour empêcher les amphibiens de s'échapper. Pour les espèces qui passent de la larve aquatique à l'adulte terrestre, des mesures doivent être prises pour éviter les noyades. Par exemple, à l'approche de la métamorphose, on peut installer des plateformes ou incliner le bassin pour permettre la sortie hors de l'eau.

Des pipettes en plastique devraient être utilisées pour tout déplacement de larves nouvellement écloses. Selon la taille des larves, il est également possible d'utiliser avec succès des filets à mailles fines et douces. On ne devrait pas utiliser de gants en latex.

Les procédures de soins de la progéniture dépendent de l'espèce. Pour certaines espèces d'anoures, les systèmes d'élevage à haute densité, décrits par Browne et ses collègues (2003), peuvent être appropriés pour permettre aux larves d'atteindre la métamorphose.

Les larves de salamandres sont cannibales et devraient être hébergées individuellement. En groupe, elles deviennent agressives lorsqu'il y a compétition pour la nourriture. Il est important de garantir une source régulière de proies suffisamment petites à mesure que la larve terrestre se transforme en forme adulte définitive (p. ex. grillons, chenilles de la fausse-teigne et drosophiles incapables de voler si possible). Il est recommandé d'ajouter des suppléments alimentaires à la nourriture des larves en nourrissant les proies avant leur distribution ou en les saupoudrant de calcium et de vitamines. Si la première option est choisie, il faut distribuer les insectes immédiatement avant que les suppléments soient métabolisés.

Les Céciliens néonatals, à l'exception des *Typhlonectidae* qui sont strictement aquatiques, ont des besoins environnementaux et nutritionnels similaires à ceux des adultes (Browne et Zippel, 2007). Comme ils se métamorphosent et perdent leurs branchies peu de temps après la naissance, les femelles gravides devraient être hébergées en eau peu profonde (3 cm) (Browne et Zippel, 2007).

5.5.1 *Xenopus*

Les têtards devraient être nourris avec des aliments adaptés (p. ex. de la nourriture pour têtards ou de la spiruline en poudre) lorsque les *Xenopus* atteignent les stades 37 et 38[8], soit 5 à 10 jours après la fécondation (Green, 2010). La fréquence des repas devrait être au moins deux fois par semaine et être supervisée pour éviter la suralimentation, ce qui nuit à la qualité de l'eau. Une fois les bourgeons des membres formés (stades 65 et 66), les animaux devraient progressivement être nourris avec des granulés pour adultes (Green, 2010). Le développement des têtards est influencé à la fois par la température et la quantité de nourriture fournie.

Les têtards devraient être hébergés avec d'autres amphibiens de taille similaire (Green, 2010). La densité de peuplement initiale devrait être de 50 têtards par litre, et elle devrait être réduite à mesure que les animaux

8 D'après Nieuwkoop et Faber (1967).

atteignent leur pleine taille à maturité. La densité devrait être de cinq animaux par litre au début de la métamorphose et d'un animal pour 4 litres d'eau une fois les bourgeons des membres formés (Green, 2010).

En plus de pouvoir se cacher, les jeunes devraient avoir la possibilité de se reposer à la surface de l'eau, car ils ne sont pas bons nageurs et peuvent se noyer d'épuisement (Chum et coll., 2013).

On devrait remplacer de 25 à 50 % de l'eau par jour une fois que les têtards ont atteint le stade 55 (Green, 2010). À l'approche de la métamorphose, des mesures doivent être prises pour empêcher les têtards de s'échapper.

Pour éviter les blessures, les têtards devraient être sortis de l'eau à l'aide de récipients plutôt qu'avec des filets (Green, 2010).

5.5.2 Axolotls

Il faut regrouper les larves d'axolotl en fonction de leur taille dès qu'elles commencent à se nourrir pour éviter qu'elles ne se mangent les unes les autres.

Le régime alimentaire quotidien des larves (de l'éclosion jusqu'à une taille de 5 cm mesurée du nez à l'extrémité de la queue) est composé d'artémies vivantes (Khattak et coll., 2014; Duhon, 2019). On devrait éviter de leur donner des œufs non éclos ou des coquilles d'œufs qui peuvent provoquer un blocage intestinal ou dont les restes peuvent souiller l'eau. Les juvéniles (de 6 à 20 cm) sont nourris chaque jour avec des artémies congelées, des vers (tubifex) et de petits granulés de poissons (3 mm ou moins). Par la suite, la quantité d'artémies devrait être réduite jusqu'à ce qu'ils s'adaptent à un régime composé uniquement de granulés de poissons (Khattak et coll., 2014). L'introduction trop précoce de granulés peut entraîner des problèmes.

Les larves sont sensibles aux maladies. On devrait donc les nourrir suffisamment, tout en maintenant une bonne qualité de l'eau, et ne pas les héberger dans des conditions de surpopulation (Duhon, 2019). La quantité de nourriture donnée devrait rassasier les animaux, mais il ne devrait pas avoir de restes dans l'eau (Duhon, 2019). L'eau devrait être changée 2 à 4 heures après avoir nourri les animaux, car les restes d'artémies entraînent une détérioration rapide de la qualité de l'eau. Les jeunes larves fraîchement écloses peuvent être conservées dans des bols en verre peu profonds, à une densité de 50 animaux ou plus par bol de 20 cm de diamètre (Duhon, 2019). À mesure que les larves se développent, la densité devrait être réduite et les animaux devraient être regroupés en fonction de la taille (Duhon, 2019). Le taux de croissance dépend de la température, de la fréquence et de la quantité de nourriture, ainsi que du nombre d'animaux par bol; à l'âge de 6 à 8 semaines, les larves devraient mesurer environ 2,5 cm (Duhon, 2019).

6 SOINS ET GESTION

Les personnes concernées devraient consulter les *Lignes directrices du CCPA : les soins et la gestion des animaux en science* (CCPA, 2017) pour prendre connaissance des principes généraux qui s'appliquent à toutes les espèces. La présente section contient des renseignements supplémentaires qui concernent spécifiquement les amphibiens.

L'hébergement, les soins et la gestion des amphibiens devraient simuler les conditions naturelles pour chaque espèce, en tenant compte du bien-être des animaux et de la nécessité pour le personnel de les observer (Tinsley, 2010).

6.1 IDENTIFICATION

Les renseignements énumérés dans la section 2, « Identification des animaux », des *Lignes directrices du CCPA : les soins et la gestion des animaux en science* (CCPA, 2017), devraient être clairement affichés sur chaque unité aquatique. La nécessité d'une identification individuelle des animaux devrait être justifiée, et la méthode utilisée devrait être la moins invasive et la mieux adaptée aux objectifs de l'étude.

Les méthodes d'identification à privilégier pour les amphibiens sont les marques naturelles et le marquage à l'élastomère. D'autres méthodes (p. ex. les puces électroniques et les transpondeurs, les bagues ou les étiquettes en plastique, les étiquettes en fil métallique microcodées, les marqueurs radioactifs) peuvent convenir dans certaines circonstances. Voir l'annexe 2 pour connaître les avantages et les inconvénients des différentes méthodes.

6.2 OBSERVATION

Comme mentionné à la section 3.3, « Personnel », les amphibiens doivent être observés régulièrement par un personnel qualifié, et des procédures normalisées de fonctionnement devraient décrire la fréquence d'observation pour chaque espèce. Chez les espèces qui se cachent, le dérangement causé par le fait de déterrer les animaux ou d'enlever le couvercle du vivarium ou de l'aquarium pour mieux observer doit tenir compte des questions de santé. Toutefois, tous les systèmes de maintien du milieu de vie des animaux (confinement et environnement) doivent être vérifiés tous les jours.

6.3 CONDITIONS D'HÉBERGEMENT

De nombreux amphibiens peuvent être hébergés en groupe par espèce; cependant, ils devraient être regroupés en fonction de la taille, car les plus imposants peuvent essayer de manger les plus petits. Pour ne pas retarder la croissance des larves, on devrait éviter leur surpeuplement.

6.3.1 *Xenopus*

Les grenouilles devraient être hébergées en groupes stables avec d'autres grenouilles de taille similaire (Reed, 2005). Cette stabilité est importante étant donné que des espèces comme *Xenopus laevis* établissent naturellement une hiérarchie au sein des groupes (Reed, 2005).

Tout en respectant les exigences en matière de densité pour l'hébergement des grenouilles décrites dans la section 2.2.1, « Conditions spatiales », chaque bassin devrait contenir un minimum de 5 à 6 animaux pour favoriser l'alimentation (Reed, 2005; Green, 2010). Le cas échéant, une alimentation efficace dans un hébergement en groupe peut provoquer des frénésies alimentaires, mais celles-ci sont moins courantes avec un plus petit nombre de grenouilles (Reed, 2005). Par ailleurs, on devrait éviter la surpopulation, car cela peut entraîner des lésions traumatiques lors de frénésies alimentaires (Reed, 2005).

Il existe peu de preuves concernant la taille idéale des groupes, mais une fois que le nombre d'animaux nécessaire pour stimuler les comportements alimentaires est atteint, la densité devient importante (Reed, 2005). Hilken et ses collègues (1995, cité dans Reed, 2005) ont constaté que la croissance des grenouilles est beaucoup plus rapide si elles disposent d'une plus grande surface par animal qui si elles sont placées dans un bassin où la densité de population est élevée. On a également constaté que la surpopulation et un niveau d'eau insuffisant affectent la qualité des ovocytes des femelles en provoquant une régression des ovaires (Alexander et Bellerby, 1938, cité dans Reed, 2005).

La densité est appropriée lorsqu'il n'y a pas de blessure, de cannibalisme ou d'accumulation de déchets et que les grenouilles maintiennent un bon état de chair. Le système d'hébergement influence la densité optimale; les grenouilles peuvent être hébergées à une densité supérieure dans un système à passage unique par rapport à un système statique. Les animaux de certaines espèces n'aiment pas le mouvement de l'eau, le débit devrait toutefois être réglé en conséquence.

6.3.2 Axolotls

Les axolotls sont généralement hébergés individuellement lorsqu'ils ne sont pas accouplés, car cela se traduit par un meilleur taux de reproduction que lorsqu'ils sont hébergés en groupe (Duhon, 2019). En outre, les axolotls se nourrissent par réflexe et, en groupe, ils se mordent régulièrement les uns les autres. Ce comportement se manifeste dès le jeune âge, lorsque les axolotls commencent à se nourrir.

L'axolotl adulte peut être hébergé individuellement dans un bocal de 4 litres ou en groupe de trois à quatre individus dans une bassine en plastique (25 cm x 46 cm x 15 cm) (Duhon, 2019). Ils peuvent être hébergés avec succès dans des aquariums avec eau filtrée (deux adultes dans un contenant de dix gallons) (Duhon, 2019), mais on devrait vérifier que le débit d'eau n'est pas excessif. Un volume d'eau de 2 litres par axolotl est suffisant si les animaux peuvent complètement s'immerger dans l'eau et que l'eau est changée fréquemment (Duhon, 2019). Les axolotls devraient avoir la possibilité de se cacher, sauf si cela nuit à l'étude.

Les larves ont besoin de volumes beaucoup plus petits. Par exemple, un axolotl de 3 cm peut être conservé dans 50 ml d'eau, et un juvénile de 10 cm, dans 200 à 300 ml d'eau, pourvu que les dimensions répondent au moins aux normes minimales de performance précisées dans la section 2.2.1, « Conditions spatiales ».

6.4 ALIMENTATION ET EAU

Les amphibiens ont généralement des habitudes alimentaires pointues, la plupart se nourrissant en fonction des mouvements de leurs proies (Pough, 2007). Il est important d'effectuer une recherche documentaire pertinente sur les besoins nutritionnels de chaque espèce hébergée en captivité. Comme l'information disponible est limitée, un régime alimentaire différent de l'alimentation en milieu naturel peut être à l'origine de carences nutritionnelles chez les individus de nombreuses espèces hébergés. En général, les amphibiens hébergés en captivité devraient avoir un régime alimentaire naturel, ou être nourris avec des aliments de même valeur nutritive. L'approvisionnement en nourriture devrait toutefois provenir d'une source fiable afin d'éviter l'introduction d'agents pathogènes et d'autres variables.

Les amphibiens en captivité sont souvent nourris avec des insectes. Pour une alimentation complète, on devrait donner aux amphibiens divers types d'insectes, ainsi que des suppléments de vitamines et de minéraux (Pough, 2007). Les vitamines et les minéraux peuvent être saupoudrés sur un insecte juste avant de nourrir les amphibiens ou être inclus dans la nourriture des insectes (Pough, 2007).

Lorsque les établissements se procurent des aliments surgelés, des précautions doivent être prises pour éviter la contamination lors de la décongélation et de la recongélation. Seuls des aliments congelés de haute qualité devraient être achetés et remballés en petites quantités le plus rapidement possible pour éviter la décongélation. Les aliments congelés ne devraient pas être décongelés à la température de la pièce.

Lors de l'ajout de produits alimentaires non vivants au régime des amphibiens, il est important de savoir que certaines espèces nécessitent un conditionnement intensif pour que l'amphibien s'approche de la nourriture. Les réserves alimentaires des amphibiens peuvent donc s'épuiser dangereusement au cours du processus.

Il n'est généralement pas nécessaire de nourrir les amphibiens adultes tous les jours. Dans la plupart des cas, on devrait les nourrir 1 à 3 fois par semaine, chaque fois jusqu'à satiété.

Les anoures adultes sont des prédateurs et, dans leur habitat naturel, ils ont une alimentation variée : vers de terre, limaces, grillons, larves d'insectes, insectes volants (aliment préféré des grenouilles) et autres vertébrés (aliment pour les grenouilles léopards et ouaouarons de grande taille). En captivité, les crapauds sont parmi les amphibiens les plus faciles à nourrir, car ils mangent une grande variété de vers, limaces, grillons et larves d'insectes aisément disponibles à longueur d'année. Les mouches à fruits incapables de voler sont une nourriture appropriée lors de la métamorphose chez certaines espèces, comme le crapaud d'Amérique.

La plupart des *Lithobates (Rana)* spp. adultes se nourrissent uniquement d'insectes en vol ou d'autres proies en mouvements. Plusieurs types de nourriture (p. ex. grillons, vers, mouches) devraient être proposés pour encourager les amphibiens à manger. Le comportement alimentaire de certains individus peut être stimulé en faisant pendre devant eux un objet alimentaire non vivant. Par ailleurs, de nombreuses grenouilles sont perturbées par la présence humaine et ne s'alimentent pas. Les amphibiens devraient être gavés seulement en cas d'urgence.

La plupart des larves d'anoures sont herbivores ou détritivores; elles se nourrissent d'algues, de plantes aquatiques supérieures et de débris organiques dans le substrat. En captivité, elles se nourrissent de morceaux de légumes à feuilles vertes, ramollis dans de l'eau bouillante. Comme leur contenu nutritionnel varie, on devrait sélectionner ces légumes en fonction de leur valeur nutritionnelle (Kohman, 1939). Pour certaines espèces, les épinards peuvent entraîner des dépôts de cristaux d'oxalate de calcium dans les reins avec des conséquences fatales (Briggs, 1941; Forzán et coll., 2015). Les larves d'anoures peuvent également être nourries de granules d'algues et de la plupart des types d'aliments secs préparés pour poissons d'aquarium offerts

sur le marché. Les quelques espèces dont les têtards sont des prédateurs (p. ex. *Scaphiopus bombifrons* et *S. intermontanus*) peuvent être nourries d'artémies. Les têtards ne devraient pas être suralimentés et les aliments non consommés devraient être immédiatement retirés pour éviter la contamination de l'eau.

Les salamandres aquatiques (adultes et larves) se nourrissent d'une grande variété d'invertébrés aquatiques : sangsues, escargots, crustacés et larves d'insectes aquatiques. Les salamandres de grande taille peuvent également consommer des poissons ou d'autres amphibiens. En captivité, plusieurs espèces de salamandres aquatiques mangent entre autres des artémies congelées, des vairons entiers congelés et des morceaux de filets de poisson.

Les salamandres terrestres se nourrissent de vers de terre, de limaces, de larves et de nymphes d'insectes, ainsi que d'une grande variété d'insectes adultes non volants et d'autres arthropodes. En l'absence de proies vivantes, les cœurs de poulet sont une bonne source de protéine, mais ils devraient être saupoudrés de suppléments (p. ex. vitamines, calcium).

En captivité, les espèces *Ambystoma* et *Plethodon* sont nourries avec succès de vers de terre et de chenilles de la fausse-teigne. *Ambystoma tigrinum* se nourrit de larves de cucujides (*Tenebrio molitor*), mais il est préférable de ne pas adopter ce régime à long terme puisque les exosquelettes lourds et chitineux sont indigestes et peuvent provoquer des occlusions intestinales. Les amphibiens qui se nourrissent uniquement de larves de ténébrions peuvent développer des carences nutritionnelles. Il est préférable de leur donner des invertébrés qui ont récemment mué et qui sont plus digestes.

6.4.1 *Xenopus*

La quantité, la fréquence et le type de nourriture des régimes alimentaires varient, mais il faut toujours offrir une quantité suffisante de nourriture de qualité pour une santé optimale (Reed, 2005). Même si les grenouilles à l'état sauvage peuvent survivre longtemps sans nourriture, ce n'est pas sans conséquence physiologique (Reed, 2005).

Les insectes sont une proie courante pour les *Xenopus* adultes (Reed, 2005) qui acceptent néanmoins des aliments non vivants (Reed, 2005). Des granulés de différentes tailles et concentrations en protéines sont disponibles, adaptés à la taille et à l'âge des grenouilles et des têtards (Green, 2010). Si les granulés ne sont pas destinés aux *Xenopus*, le produit devrait contenir une liste d'ingrédients équivalente selon l'information fournie sur l'emballage. Le foie de bœuf, bien qu'un aliment courant, peut entraîner des maladies si des suppléments ne sont pas donnés (Reed, 2005; Green, 2010) et est associé à une épidémie de chlamydia (Green, 2010). Les asticots, les grillons et les vers permettent d'enrichir l'environnement des grenouilles et les stimulent (Reed, 2005; Green, 2010). Comme le *Xenopus* développe des préférences alimentaires, on devrait introduire tout nouvel aliment en le mélangeant avec la nourriture habituelle (Green, 2010).

Les grenouilles peuvent être nourries à la fin de la journée pour imiter leur comportement naturel et éliminer les perturbations pendant la digestion (Reed, 2005). Les nourrir à ce moment-là peut être particulièrement important pour les grenouilles qui semblent ne pas manger. La nourriture devrait être consommée dans les 15 à 20 minutes qui suivent une frénésie alimentaire; la présence de nourriture dans l'eau quelques heures après indique que la quantité fournie était trop importante (Green, 2010). La nourriture non consommée contamine l'eau, mais l'enlever moins de 3 à 5 heures après que les grenouilles se sont nourries peut les perturber et provoquer des régurgitations (Reed, 2005). La quantité de nourriture devrait donc être soigneusement calculée afin que les grenouilles aient suffisamment à manger sans que des restes d'aliments traînent dans les bassins pendant la nuit.

Aux premiers stades du développement, *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis* reçoivent la même quantité de nourriture à une fréquence de deux fois par jour (McNamara et coll., 2018). Ils devraient être nourris aux algues jusqu'à ce que leur queue commence à se résorber. À l'âge de huit semaines pour *Xenopus laevis* et de cinq mois pour *Xenopus tropicalis*, l'horaire des repas devrait être modifié pour passer à une fois par jour, cinq jours par semaine (McNamara et coll., 2018). À ce stade et au fur et à mesure de leur croissance, ils peuvent manger une quantité croissante de granulés. À l'âge adulte, on nourrit les *Xenopus laevis* deux fois par semaine et les *Xenopus tropicalis* trois fois par semaine (McNamara et coll., 2018).

6.4.2 Axolotls

Les axolotls adultes et juvéniles peuvent être nourris avec une variété d'aliments, notamment des artémies congelées, des granulés de saumon ou de truite, des daphnies, des larves de moustiques, des vers de terre, des tubifex congelés et du foie ou du cœur de bœuf (Duhon, 2019). Les axolotls adultes sont nourris trois fois par semaine avec des granulés de 3 à 5 mm (Khattak et coll., 2014) jusqu'à satiété, et pas plus de cinq granulés à la fois (Duhon, 2019). La nourriture doit couler au fond de l'aquarium pour être consommée par les axolotls. Les restes devraient être retirés quelques heures après l'alimentation (Khattak et coll., 2014).

Les larves d'axolotls devraient être nourries avec des artémies écloses et des larves de moustiques. Ces dernières sont faciles à produire et peuvent être récoltées au stade de développement approprié à l'âge des larves d'axolotls (NRC, 1974). On peut également nourrir les larves d'axolotls avec de petites daphnies ou de très petits vers (*Tubifex sp.* ou *Enchytraeus sp.*).

Si les animaux sont nourris avec des granulés, l'eau devrait être changée chaque jour pour les jeunes animaux et au moins tous les deux jours pour les adultes afin d'éviter l'accumulation d'ammoniac et d'autres déchets métaboliques et de prévenir le développement de populations importantes de bactéries (Duhon, 2019).

6.5 ENRICHISSEMENT ENVIRONNEMENTAL

Principe directeur 11

L'enrichissement environnemental doit être évalué en fonction de l'espèce d'amphibiens et de l'étape de son cycle de vie.

Les animaux devraient être libres d'adopter des comportements naturels autant que possible. Cependant, les consignes précises pour permettre des comportements naturels dépendent des animaux concernés, car les amphibiens occupent un large éventail d'habitats naturels, ont des étapes du cycle de vie variées et se déplacent de différentes manières. En général, les études sur l'enrichissement environnemental pour les amphibiens se limitent principalement aux abris pour *Xenopus*, un ajout qui semble présenter des avantages à la fois physiologiques et psychologiques (Michaels et coll., 2014a).

Les exigences de base pour répondre aux besoins physiques et comportementaux des amphibiens sont décrites dans d'autres sections du présent document :

- la dimension des unités devrait permettre aux amphibiens de démontrer des comportements importants pour leur bien-être et de favoriser d'autres comportements qui améliorent leur qualité de vie (voir la section 2.2, « Vivariums et aquariums de laboratoire »);

- les animaux devraient pouvoir se réfugier dans des abris ou d'autres cachettes (voir la section 2.2.5, « Aménagement »);
- les amphibiens devraient être regroupés en fonction de la taille et hébergés en groupe si cela est bénéfique pour les animaux (voir la section 6.3, « Gestion de l'hébergement »).

Des éléments ajoutés pour enrichir le milieu des animaux doivent être considérés dans un contexte individuel, et en fonction du système d'hébergement et des exigences de l'étude. Toute structure ajoutée à des fins d'enrichissement devrait avoir des surfaces lisses et des bords arrondis afin de réduire le risque de blessure chez les animaux (Conseil de l'Europe, 2004, cité dans Reed, 2005), et ne doit pas entraîner de problèmes de débit de l'eau ou de nettoyage qui pourraient nuire à la santé des animaux.

Les vivariums et les aquariums pour les grenouilles et les crapauds doivent permettre des activités naturelles comme sauter, et ce, sans risque de blessure. Des tapis en caoutchouc peuvent être ajoutés au fond du bassin pour éviter les abrasions des coussinets des pattes et les escarres. Des rampes et des perchoirs devraient être prévus pour ajouter de la variété au milieu. Des boîtes dans lesquelles les grenouilles peuvent se cacher et des plateformes où elles peuvent aller pour se sécher si nécessaire devraient également être ajoutées.

Les amphibiens semi-terrestres adultes devraient avoir accès à la terre ferme pour sortir complètement de l'eau et à une nappe d'eau pour s'immerger complètement et nager ainsi qu'à un substrat en déclivité qui leur permet de se déplacer librement dans et hors de l'eau. Les salamandres devraient être hébergées dans un milieu ou la teneur en eau du sol varie.

Les espèces fouisseuses devraient pouvoir s'enfouir entièrement à leur profondeur préférée.

L'hébergement des espèces arboricoles devrait être équipé de structures complexes aux caractéristiques diversifiées (épaisseur, hauteur, densité).

6.5.1 *Xenopus*

Dans l'animalerie, on devrait s'efforcer de fournir un environnement enrichi pour les *Xenopus*.

Les objets flottants sur l'eau (p. ex. les nénuphars en plastique offerts sur le marché ou les sacs poubelles noirs découpés en différentes formes flottantes) peuvent servir de cachette aux *Xenopus* qui se réfugient en dessous (Brown et Nixon, 2004, cité dans Reed, 2005). Le *Xenopus tropicalis* préfère un milieu couvert réalisé en plaçant au-dessus de l'aquarium un couvercle noir opaque ou rouge transparent; toutefois, les couvercles transparents permettent au personnel de mieux observer les animaux (Cooke, 2018). Ces objets doivent être placés pour permettre aux grenouilles d'accéder facilement à la surface de l'eau pour respirer (Reed, 2005).

Des pierres, des roches ou galets de taille moyenne à grande peuvent ajouter de la variété à un bassin (Beck, 1994, cité dans Reed, 2005), notamment s'ils sont placés de manière à permettre aux grenouilles de passer entre la roche et la paroi du bassin (Kaplan, 1993, cité dans Reed, 2005). Si la stérilisation ou la lixiviation suscitent des inquiétudes, des moules en plastique peuvent être utilisés pour créer des roches à partir de matériaux sécuritaires (Reed, 2005).

Les petites roches ne devraient pas être utilisées, car elles peuvent être ingérées par les animaux (Beck, 1994, cité dans Reed, 2005; Chum et coll., 2013) et peuvent nuire au nettoyage. Dans les tests de choix, les grenouilles n'ont pas montré une préférence pour les sols en gravier (Brown et Nixon, 2004, cité dans Reed, 2005). L'ajout de plantes en plastique devrait également être soupesé, particulièrement celles qui ont des feuilles fines et pointues ou qui peuvent être facilement déchiquetées.

6.5.2 Axolotls

Les axolotls sont des animaux solitaires. Leurs besoins fondamentaux, à savoir un éclairage et une température appropriés ainsi qu'un environnement autant que possible sans vibrations, sont examinés dans la section 3, « Gestion et personnel de l'installation ». Toutefois, on manque d'information sur les éléments qui peuvent enrichir leur milieu. Des données non scientifiques indiquent que les axolotls peuvent jouer avec des balles, mais les avantages d'un tel ajout ne sont pas prouvés. Si du gravier est utilisé dans l'aquarium, il devrait être grossier pour éviter que les axolotls ne l'ingèrent (Duhon, 2019).

6.6 MANIPULATION ET CONTACT HUMAIN

On devrait manipuler les amphibiens le moins possible et prendre des précautions pour éviter de les stresser ou de les blesser. La peau glandulaire et la couche de mucus qui protège la peau des amphibiens peuvent être facilement endommagées par les manipulations, et leur système de lignes latérales est très sensible (Elepfandt, 1996a, cité dans Reed, 2005).

Le personnel devrait porter des gants en nitrile pour manipuler les amphibiens, et les gants devraient être humides même lorsqu'il s'agit d'amphibiens terrestres (Sirois, 2015). Les traces de lotion ou d'autres produits utilisés par le personnel, y compris les résidus de savons, et l'acidité normale de la peau des humains peuvent être nocifs pour les amphibiens (Girling, 2013). De plus, toute rugosité ou callosité sur les mains ou les ongles peut causer des abrasions sur la peau fine de ces animaux (Wright et Whitaker, 2001). Les gants protègent également le personnel (voir la section 13, « Sécurité des personnes »).

Les gants en latex ne devraient pas être utilisés, car ils libèrent des composés inflammatoires qui sont nocifs pour les amphibiens. De plus, les gants doivent être exempts de poudre.

On craint que les gants réduisent la sensibilité (Reed, 2005). Le personnel qui manipule les amphibiens doit en être conscient et veiller à ne pas exercer de pression excessive sur les amphibiens.

Avant de manipuler des amphibiens, on devrait se nettoyer soigneusement les mains malgré le port de gants.

6.6.1 *Xenopus*

La méthode à privilégier pour retirer les grenouilles d'un bassin est d'utiliser un petit récipient pour les sortir avec un peu d'eau du bassin. Cette méthode est probablement moins stressante ou moins nocive pour l'animal que la manipulation, mais elle n'est pas pratique si le bassin est profond et contient un grand nombre de *Xenopus* ou s'il faut capturer des individus en particulier (Reed, 2005). On considère que les filets en nylon fin causent moins de dommages au mucus sur la peau des grenouilles et sont moins traumatisants que la manipulation (Green, 2010). Une certaine prudence est toutefois à observer, car les filets peuvent causer des microlésions sur la peau de la grenouille ou les doigts de l'animal peuvent rester coincés dans les mailles (Reed, 2005). Les filets devraient être nettoyés après utilisation (voir la section 6.7, « Nettoyage et désinfection »).

Il existe deux méthodes courantes pour tenir, si nécessaire, les *Xenopus* : 1) placer la tête de l'animal entre les deux premiers doigts de la main, le corps de l'animal dans la paume et le cou doucement retenu par le pouce; ou 2) placer une main sur le dos de l'animal, l'index entre les pattes arrière de l'animal et saisir l'animal au milieu du corps (Reed, 2005). Le recours à une autre méthode que celles décrites ici devrait être discuté avec le vétérinaire.

6.6.2 Axolotls

Des filets en nylon fin devraient être utilisés pour manipuler les axolotls. Comme la peau de l'axolotl est glissante, il est possible de les écraser et de les blesser.

6.7 NETTOYAGE ET DÉSINFECTION

Le nettoyage devrait être basé sur les caractéristiques du bassin, la capacité du système à maintenir la qualité de l'eau et le régime alimentaire des animaux (Reed, 2005).

Pour les espèces aquatiques, la qualité de l'eau doit être prise en compte tout en réduisant au minimum les perturbations pour les animaux (Reed, 2005). Les grenouilles chaque jour soumises à un remplacement de l'eau ont un taux de croissance inférieur à celui des grenouilles hébergées dans un bassin où l'eau est remplacée une fois par semaine (Hilken et coll., 1995, cité dans Reed, 2005). On ne devrait pas remplacer complètement l'eau. On devrait siphonner, en plus des restes de nourriture et des excréments, un quart ou la moitié de l'eau au fond du bassin et la remplacer par de l'eau propre de la même température. S'il est nécessaire de changer complètement l'eau, cela devrait être effectué toujours au même moment de la journée (Schultz et Dawson, 2003), de préférence après avoir nourri les animaux alors que la qualité de l'eau est mauvaise (DeNardo, 1995, cité dans Reed, 2005). Il est important que les grenouilles soient hébergées dans une eau ayant la même température et les mêmes propriétés physicochimiques (p. ex. la salinité, le pH) pendant le nettoyage de leur vivarium ou aquarium.

Pour les animaux terrestres comme les salamandres, on devrait vérifier quotidiennement la présence de déchets animaux (les boulettes fécales sont généralement visibles) et on devrait les éliminer en touchant le moins possible au substrat. Le substrat devrait être en grande partie remplacé chaque année. En cas de modification importante du sol, l'équilibre entre les espèces de faune et de flore utiles et les espèces indésirables peut être rompu et la prolifération de champignons ou de moisissures est alors souvent observée. Si des modifications importantes du substrat sont nécessaires, on devrait en conserver une partie suffisante pour ensemencer le nouveau substrat avec les organismes aux effets bénéfiques. Le pH devrait également être constant (Sugalski et Claussen, 1997; Mushinsky, 1975).

Dans la plupart des cas, les accessoires et les vivariums ou aquariums devraient être nettoyés à l'eau chaude uniquement. Les bassins et l'équipement (p. ex. les filets et les seaux) peuvent être nettoyés à l'eau chaude avec une brosse ou une éponge douce (Green, 2010). En cas de risque de maladie, des pratiques plus strictes peuvent être nécessaires en plus de recourir au lavage à l'acide.

Les détergents et les désinfectants devraient être évités, car ils sont nocifs pour les amphibiens. Quand des désinfectants sont utilisés, les surfaces doivent être soigneusement rincées et séchées en plus de ne pas présenter de risque pour les animaux. Si un stérilisant est nécessaire, on devrait utiliser un hypochlorite de qualité alimentaire et on devrait bien rincer et faire sécher les bassins avant d'y remettre les amphibiens (Reed, 2005). Les savons ne devraient pas être utilisés, car ils laissent des résidus difficiles à éliminer. Les produits chimiques utilisés pour le nettoyage (p. ex. les détergents, les oxydants) ne devraient pas entrer en contact direct avec les animaux.

Si des contenants en plastique sont utilisés, ils doivent toujours être très propres, car des bactéries peuvent se développer sur les parois.

6.8 REGISTRES

Les exigences générales en matière de tenue de registres sont présentées en détail dans la section 12, « Tenu de registres », des *Lignes directrices du CCPA : les soins et la gestion des animaux en science* (CCPA, 2017). Comme indiqué dans le présent document à la section 6.2, « Observation », les systèmes de maintien du milieu de vie des amphibiens doivent être vérifiés tous les jours et les animaux doivent être observés régulièrement, à une fréquence précisée dans les procédures normalisées de fonctionnement propre à l'espèce visée. Les vérifications et les observations doivent être consignées dans les registres.

7 MANIPULATION ET CONTENTION

7.1 MANIPULATION

Principe directeur 12

Les amphibiens devraient être manipulés seulement si nécessaire et le moins longtemps possible.

Pour la manipulation des animaux si nécessaire dans le cadre de soins et de gestion des amphibiens, voir la section 6.6, « Manipulation et contact humain ».

7.2 CONTENTION PHYSIQUE

La méthode de contention dépend de la forme du corps de l'animal (Girling, 2013). Certains amphibiens ne tolèrent pas bien la contention physique (p. ex. pris dans la main, les petits pléthodontidés surchauffent facilement), et les tentatives de contention de ces espèces peuvent causer des lésions chez les animaux.

Les grenouilles et les crapauds de taille moyenne ou grande (environ 5 g et plus) devraient être saisis par la taille (immédiatement à l'avant des membres postérieurs), les membres postérieurs complètement étendus. Pendant la contention, on devrait empêcher les animaux de fléchir les hanches et les genoux pour éviter les coups de patte. Quant aux animaux de grande taille, les pattes avant devraient être également maintenues. Girling (2013) suggère de placer une main autour de la ceinture pectorale, immédiatement derrière les membres avant, et l'autre main sous les membres postérieurs. D'autres techniques de contention des grenouilles pour les injections sont décrites par Browne (s.d.).

Pour la contention des petites salamandres, on devrait appliquer une pression uniforme sur tout le corps de l'animal avec une main ouverte, à plat. On devrait éviter toute pression sur la queue. Les salamandres de taille moyenne ou grande (environ 5 g et plus) devraient être saisies entre les membres antérieurs et les membres postérieurs, au milieu du corps. Girling (2013) suggère de tenir la ceinture pectorale par la face dorsale, l'index et le pouce autour d'un membre antérieur et le deuxième et troisième doigt autour de l'autre, et tenir l'animal de manière similaire de l'autre main.

Les salamandres ne doivent pas être saisies par la queue, car une autotomie de la queue peut se produire. Certaines salamandres peuvent également perdre leur queue lors d'une manipulation brusque (Girling, 2013). Il ne s'agit pas d'une blessure grave, mais l'atteinte peut influencer la croissance et la reproduction futures en privant l'animal de ses réserves de graisse et affecter son comportement, comme cela a été signalé chez les reptiles (voir Ballinger, 1973; Derickson, 1976; Bellairs et Bryant, 1985).

Les larves de salamandres et les salamandres néoténiques ne doivent pas être saisies par la tête ou le cou, car cela peut endommager leurs branchies.

7.3 CONTENTION CHIMIQUE

La contention chimique peut être nécessaire dans le cas d'animaux de très petite taille ou autrement difficiles à manipuler lors de certaines procédures ou lorsque la contention physique peut causer des blessures ou un stress trop important chez l'animal. Un vétérinaire expérimenté dans l'administration d'anesthésiques chez les amphibiens devrait être consulté quand on planifie une contention chimique dans le cadre d'un nouveau projet ou d'une étude qui fait appel à une nouvelle espèce. Les espèces et même les individus réagissent différemment aux anesthésiques. On devrait consulter la documentation spécialisée et les personnes expérimentées avec l'espèce visée. Pour des informations concernant l'utilisation d'anesthésiques, voir la section 10.10.1, « Anesthésie ».

8 SANTÉ ET PRÉVENTION DES MALADIES

Principe directeur 13

Le programme de santé animale devrait être destiné à tous les amphibiens, sans exception, qu'ils soient hébergés dans l'animalerie principale ou ailleurs dans les installations de l'établissement.

Au moins un vétérinaire doit participer à l'élaboration du programme de santé animale. Ce programme devrait être approuvé par le comité de protection des animaux, être supervisé par des personnes compétentes en la matière, et être composé des éléments suivants :

- les stratégies de prévention des troubles de santé qui sont adaptées à l'état de santé des animaux et à la recherche;
- l'évaluation de tous les animaux et celle de l'état de santé de chaque colonie pour surveiller la santé et la détecter les maladies latentes;
- un plan d'urgence pour la gestion en cas d'éclosion soupçonnée d'une maladie.

8.1 PRÉVENTION DES MALADIES

Principe directeur 14

Des mesures stratégiques pour la prévention des maladies devraient inclure un programme de prévention des maladies et des mécanismes de suivi et de rapports périodiques d'évaluation de l'état de santé.

Les animaux devraient être exempts de germes pathogènes et de maladies cliniques, à moins que cela fasse partie d'un protocole approuvé. Un vétérinaire devrait établir des procédures normalisées de fonctionnement pour réduire le risque d'introduction de maladies dans les installations, et devrait fournir au besoin des conseils sur toute question relative à la santé des animaux.

Le plan de prévention et de lutte contre les maladies devrait comprendre les mesures suivantes :

- l'acquisition – le bon état de santé des amphibiens devrait être confirmé par un bilan réalisé récemment par le fournisseur, et les animaux devraient être examinés à la réception (voir la section 4, « Acquisition »);
- la quarantaine – les nouveaux animaux devraient être séparés des amphibiens déjà hébergés dans les installations (voir la section 4.5, « Réception des amphibiens »);
- la gestion des installations – les installations, l'équipement et les pratiques de gestion en place devraient permettre de prévenir la transmission de microorganismes (voie aérienne ou aquatique, contact direct

or vecteur passif), la contamination de l'eau, l'entrée d'animaux nuisibles et les contaminants de sources externes;

- la gestion des soins – l'alimentation des amphibiens devrait être de bonne qualité et des procédures devraient être mises en place pour bien nettoyer les bassins et y éviter la surpopulation;
- la biosécurité pour les animaux – des procédures normalisées de fonctionnement devraient restreindre l'accès aux installations;
- l'hébergement provisoire – des plans devraient être prévus pour héberger les animaux contaminés séparément des autres en cas d'éclosion de maladies dans les installations et pour établir une stratégie de lutte contre les maladies.

Il est important que tous ces éléments soient inclus dans le plan de prévention et de lutte contre les maladies. Comme l'a noté Green (2010), la plupart des problèmes cliniques observés chez les *Xenopus* peuvent être attribués aux pratiques de soins, de manipulation et de gestion.

Un programme complet de surveillance de la santé en continu est essentiel, bien que cela ne soit pas suffisant en soi pour s'assurer que les animaux sont exempts d'agents pathogènes ou infectieux susceptibles d'affecter la recherche compte tenu du caractère rétrospectif d'un tel programme. Comme la présence d'agents infectieux peut avoir des répercussions sur les données expérimentales même sans provoquer une maladie, la biosécurité pour les animaux est une composante importante d'un programme préventif en matière de santé.

8.2 SURVEILLANCE DE L'ÉTAT DE SANTÉ ET DÉTECTION DES MALADIES

Principe directeur 15

Des procédures normalisées de fonctionnement devraient être établies pour évaluer la santé de l'animal, fournir des soins et traiter des problèmes de santé courants chez les animaux et, afin d'en assurer la pertinence, elles devraient être examinées tous les trois ans.

Des procédures normalisées de fonctionnement devraient être élaborées pour les vérifications courantes de la santé et du bien-être de la colonie et de ses individus, en fonction de l'espèce, du sexe, de l'âge, de l'étape du cycle de vie et de l'état de santé des animaux, du système d'hébergement, du type de recherche et des effets potentiels sur les autres animaux de l'établissement. Les exigences en matière de surveillance de la santé des animaux et de lutte contre les maladies dépendent également de la durée de l'hébergement des animaux. Un programme de surveillance de la santé peut inclure la surveillance de l'environnement, dans la pièce (p. ex. température, humidité) et dans le bassin (p. ex. paramètres de qualité de l'eau décrits à la section 3.1.3, « Qualité de l'air et de l'eau », surveillance du substrat ou de la colonne d'eau pour détecter toute présence de moisissures ou de champignons). Il faut déterminer les procédures d'évaluation nécessaires (p. ex. intervalles entre les essais, sélection des agents, vérifications). Il est essentiel que les échantillons prélevés et la technique de dépistage utilisée soient spécifiques au pathogène recherché, et que cette procédure respecte autant que possible le principe de réduction.

Les programmes de surveillance de l'état de santé et de détection des maladies devraient évoluer en fonction de la prévalence des maladies dans la région et de nouveaux renseignements sur la santé des amphibiens. À cet effet, on devrait consulter la documentation sur les maladies chez les diverses espèces et les procédures.

Le cas échéant, l'analyse moléculaire d'échantillons prélevés sur les animaux ou dans leur environnement est fortement recommandée pour le dépistage d'agents pathogènes, parce que cela peut permettre de remplacer les animaux sentinelles et de réduire le nombre d'animaux hébergés dans l'animalerie.

Des procédures devraient être en place pour que les préoccupations liées à la santé des animaux ou à leur bien-être soient documentées et veiller à ce que cette information soit communiquée au vétérinaire en temps opportun. Les documents devraient inclure les mesures prises, les résultats de ces mesures et les améliorations à long terme.

Chez les amphibiens, les signes de maladie sont rarement spécifiques à une maladie en particulier. Les tests de dépistage de maladies et leurs traitements chez les amphibiens sont examinés par Wright et Whitaker (2001) et par Gentz (2007). Les principaux signes de maladie chez les *Xenopus* sont décrits par Green (2010).

8.2.1 Maladies fréquentes

De nombreuses infections, comme la maladie des pattes rouges (*Red leg*, une infection bactérienne chez les grenouilles) et le *Saprolegnia* (une infection fongique chez les salamandres), pénètrent dans l'organisme par des lésions ou abrasions cutanées. D'autres facteurs sont en cause, notamment le stress dû à des conditions insalubres, l'exposition prolongée au froid et le surpeuplement (Reed, 2005).

Le syndrome de la patte rouge est une infection répandue chez les amphibiens et causée par des bactéries comme celles du genre *Aeromonas*. La maladie peut se propager dans une colonie et les animaux potentiellement infectés doivent être isolés (Reed, 2005). Voici certains des signes décrits pour cette infection : ulcère, lésion ou hémorragie cutanée, léthargie, émaciation, enflure, épanchement cœlomique, mue, nécrose, tremblements (Densmore et Green, 2007; Reed, 2005). La maladie peut néanmoins entraîner la mort sans aucun signe visible (Densmore et Green, 2007; Reed, 2005). L'autopsie peut ne pas être fiable pour le diagnostic si elle est effectuée plus de 1 à 3 heures après la mort de l'amphibien, car les bactéries envahissent rapidement les tissus (Densmore et Green, 2007). Le traitement devrait être appliqué après consultation avec un vétérinaire. Les traitements suggérés sont décrits par Densmore et Green (2007) et Reed (2005).

L'apparition de légères abrasions associées à des touffes cotonneuses (taches blanches opaques) sur la peau est souvent la première indication d'une infection fongique superficielle, comme celle causée par le *Saprolegnia*. Cela est particulièrement préoccupant chez les larves de salamandres hébergées ensemble, car elles se pincent les unes les autres. Les animaux devraient être séparés en cas de signes d'infections fongiques, en particulier les larves de salamandre, car cela dénote du cannibalisme.

Les ranavirus, présents dans le monde entier, sont responsables de la mortalité massive de nombreuses espèces d'amphibiens (CWHC, 2020; ACVP, 2020). Il peut n'y avoir aucun signe clinique d'un ranavirus, ou encore les signes peuvent être les mêmes que ceux observés dans le cas d'une sepsie bactérienne. Les bactéries sont souvent présentes comme agents pathogènes secondaires. Les ranavirus peuvent être dévastateurs pour les amphibiens, mais de bonnes pratiques de quarantaine, de soins et de gestion des animaux devraient permettre de prévenir les éclosions en milieu de recherche. Pour de plus amples informations sur les ranavirus, voir les documents préparés par la CWHC (2020) et le ACVP (2020).

De plus, les maladies suivantes devraient être prises en compte dans un programme de dépistage systématique :

- la chytridiomycose, un problème chez les amphibiens en captivité causée par un champignon pathogène ayant largement contribué au déclin des populations d'amphibiens sauvages;

- la mycobactériose, une maladie bactérienne courante chez les amphibiens;
- la chlamydiose, une infection fréquente chez les anoures;
- les nématodes, notamment *Pseudocapillaroides xenopi* qui affecte les *Xenopus* (Densmore et Green, 2007) et *Rhabdias* qui affecte les grenouilles capturées à l'état sauvage et les salamandres (Fox et coll., 2005).

On devrait également surveiller le développement de tumeurs spontanées, car des cas ont été recensés chez les amphibiens depuis bon nombre d'années (p. ex. Balls, 1962) et continus de l'être (Tsonis et Del Rio-Tsonis, 1988; O'Brien et coll., 2017).

Chez les *Xenopus*, l'hydropisie (maladie du ballonnement) est un problème d'osmorégulation caractérisé par une accumulation de liquide dans l'espace sous-cutané (Green, 2010). Elle se produit souvent en association avec une infection, une maladie rénale (Green, 2010), une septicémie ou encore une maladie cardiovasculaire ou lymphatique. L'œdème (ou ballonnement) observé chez des grenouilles hébergées dans une eau de faible conductivité peut être éliminé par le maintien d'une salinité et d'une conductivité appropriées (V. Langlois, communication personnelle, 2020). À l'apparition des symptômes de ballonnement, la conductivité et la salinité de l'eau devraient être analysées, et le dépistage de maladies bactériennes devrait également être envisagé en consultation avec un vétérinaire.

La toxicité alimentaire est associée à des aliments non consommés et partiellement décomposés qui contribuent à la croissance d'hyphes fongiques. Une fois la toxicité déclarée chez l'animal, le décès survient en quelques heures. Les animaux les moins affectés peuvent être sauvés en les retirant pour les placer dans un bassin propre avec un débit d'eau élevé et peu de turbulences.

Les maladies peuvent également provenir des pratiques d'hébergement, de soins et de gestion, comme la maladie des bulles de gaz causée par la sursaturation gazeuse de l'eau, les maladies liées à la nutrition et causées par un apport insuffisant ou excessif en calories ou de certaines vitamines ou minéraux (Densmore et Green, 2007), la déshydratation et le choc thermique.

Pour en savoir plus sur ces maladies et d'autres maladies répandues chez les amphibiens, voir Densmore et Green (2007) et Reed (2005).

8.3 LUTTE CONTRE LES MALADIES EN CAS D'ÉCLOSION INFECTIEUSE

Principe directeur 16

Il doit y avoir un plan de lutte contre les maladies en cas d'éclosion imprévue.

On doit établir un plan pour lutter contre les éclosions de maladies survenant dans l'installation ou venant de l'extérieur, prévenir la transmission d'agents pathogènes et empêcher toute récidive. Ce plan devrait notamment prévoir une stratégie de communication avec le vétérinaire, l'équipe vétérinaire, le personnel chargé des soins aux animaux, les chercheurs, le responsable de l'installation et le comité de protection des animaux. Qui plus est, on doit avoir accès à un lieu de quarantaine ou de séparation pour les animaux malades. Des dispositions devraient également être prises avec un laboratoire de santé animale pour déterminer les meilleures procédures de soumission d'échantillons pour analyses en bactériologie et en nécropsie.

En cas d'éclosion de maladie infectieuse, on doit consulter le vétérinaire pour vérifier que la technique employée permet d'éradiquer les agents pathogènes. Généralement, on met en quarantaine les amphibiens de la salle où la maladie a été détectée et on retrace tous les animaux récemment déplacés de cette salle pour les tester. Les mesures à prendre par la suite (p. ex. traitement, dépeuplement) dépendent de la nature et de l'ampleur de l'éclosion, de l'état de santé des animaux et du type de recherche. Si les animaux infectés sont euthanasiés, on doit prendre les mesures de confinement qui s'imposent lors de la manipulation et de l'élimination des animaux et du contenu des vivariums et aquariums ainsi que de la décontamination de ces unités et des salles pour empêcher la propagation de la maladie.

9 ÉVALUATION DU BIEN-ÊTRE ANIMAL

Les principes directeurs généraux pour l'évaluation du bien-être de tous les animaux utilisés à des fins scientifiques sont décrits dans les *Lignes directrices du CCPA : l'évaluation du bien-être animal* (CCPA, 2021). La présente section prolonge le travail réalisé dans ce document en se concentrant sur les indicateurs d'évaluation du bien-être des amphibiens, sans oublier que tout indicateur doit être pertinent à l'espèce selon l'étape de son cycle de vie.

Principe directeur 17

Le bien-être de tous les amphibiens hébergés dans un établissement doit être régulièrement évalué.

Un plan d'évaluation du bien-être animal devrait comprendre l'utilisation d'observations et d'autres outils qui fournissent collectivement de l'information sur la santé, le comportement et la physiologie de l'animal. Comme indiqué dans les *Lignes directrices du CCPA : l'évaluation du bien-être animal* (CCPA, 2021), l'information devrait être obtenue par un mélange de mesures liées aux animaux, aux ressources et à la gestion. L'évaluation du bien-être devrait être effectuée par une équipe formée d'auteurs de protocoles et leurs délégués, de vétérinaires et du personnel de soins aux animaux. Dans la mesure du possible, l'évaluation devrait s'appuyer sur l'information obtenue lors des activités scientifiques et vétérinaires, et lors de celles liées aux soins et à la gestion des amphibiens.

Les mesures liées aux animaux comprennent l'observation de l'animal dans le vivarium ou l'aquarium (voir la section 6.2, « Observation des animaux »), l'évaluation de la santé à l'arrivée dans l'établissement (voir la section 4.5, « Réception des amphibiens ») et dans le cadre du programme de santé animale (voir la section 8, « Santé et prévention des maladies »), et toute information supplémentaire sur la santé, le comportement ou la physiologie de l'animal obtenue dans le cadre de procédures expérimentales. Il est important d'observer régulièrement les amphibiens, mais certaines mesures liées aux animaux peuvent causer des perturbations (p. ex. déterrer l'animal ou retirer le couvercle du vivarium ou de l'aquarium pour faciliter l'observation d'une espèce qui se cache). On doit donc soigneusement peser le pour et le contre de telles perturbations lors de la conception du plan d'évaluation du bien-être. L'observation des animaux jointe aux mesures liées aux ressources et à celles liées à la gestion peut réduire les perturbations tout en obtenant les informations nécessaires pour évaluer leur bien-être. En général, les mesures liées aux animaux sont les meilleures pour déterminer l'état de bien-être réel des animaux, mais sont moins utiles pour cerner les causes spécifiques d'un bien-être compromis.

Les mesures liées aux ressources évaluent l'adéquation du vivarium ou de l'aquarium à l'animal hébergé. Michaels et ses collègues (2014b) décrivent les éléments clés de l'habitat naturel des amphibiens qui devraient être évalués dans l'environnement en captivité. Les critères d'élaboration de ce type de mesures sont décrits dans la section 2.2, « Vivariums et aquariums de laboratoire » (p. ex. taille et conception), la section 3, « Gestion et personnel de l'installation » (p. ex. qualité de l'eau, éclairage et température) et la section 6, « Soins et gestion » (p. ex. besoins en matière d'hébergement en groupes, nutrition et enrichissement

environnemental). Les mesures liées aux ressources sont les plus utiles pour cerner les causes possibles d'un bien-être compromis.

Les mesures liées à la gestion se concentrent sur l'évaluation des registres (p. ex. soins et gestion, traitements médicaux, mortalité et morbidité, procédures) pour déterminer les sources possibles d'incidence sur le bien-être des animaux. Les mesures liées à la gestion, comme celles liées aux ressources, sont utiles repérer des éléments qui peuvent compromettre le bien-être; elles sont particulièrement utiles pour en faire le suivi.

9.1 INDICATEURS DU BIEN-ÊTRE

Les amphibiens comprennent un large éventail d'espèces qui vivent dans une grande variété d'habitats, des régions tropicales aux climats tempérés avec des hivers froids. La détermination d'indicateurs de bien-être appropriés doit prendre en considération ces deux facteurs.

Il est impératif de bien connaître la biologie et le comportement des espèces étudiées afin d'évaluer le bien-être des amphibiens. Il est également important de reconnaître comment les différents facteurs peuvent affecter le comportement et les paramètres physiologiques chez différentes espèces.

Les changements de comportement ou les comportements inattendus justifient une enquête plus approfondie sur les conditions environnementales afin d'évaluer leur pertinence pour le bien-être de l'animal. Les indicateurs comportementaux du bien-être animal s'inscrivent souvent dans un spectre et ne peuvent être évalués à l'aide d'une simple liste de vérification. En outre, ils doivent être considérés dans le contexte de l'environnement de l'animal, car un changement de comportement particulier peut indiquer un degré de stress variant selon la situation. Par exemple, une diminution de la réaction d'évitement peut indiquer une léthargie ou signifier que la grenouille est habituée au personnel. De même, l'activité physique peut fluctuer compte tenu de facteurs qui ne sont pas nécessairement liés au bien-être de l'animal (p. ex. les changements saisonniers).

En général, les comportements et les paramètres physiologiques suivants peuvent servir à l'évaluation du bien-être des amphibiens hébergés individuellement ou en groupe :

- les indicateurs comportementaux en matière de bien-être :
  - les changements du comportement alimentaire (p. ex. temps et quantité avant et après une procédure ou pendant acclimatation ou une période transitoire)
  - les comportements inattendus
    - la connaissance des comportements attendus dans un contexte de captivité (p. ex. les individus en santé devraient être alarmés lorsque leur environnement est soudainement perturbé, et devraient réagir moins (c'est-à-dire aucun signe de surprise) dans le cas de pratiques courantes de soins et de gestion comme la distribution de nourriture)
  - les interactions sociales (p. ex. prépondérance des comportements agressifs au sein d'une colonie)
- les indicateurs physiologiques en matière de bien-être :
  - le taux de corticostérone
    - certaines études ont examiné les liens potentiels entre la corticostérone et la sensibilité aux infections bactériennes, et d'autres études ont utilisé la corticostérone comme une mesure de stress (Ohmer et coll., 2017, 2015; Gabor et coll., 2015; Cikanek et coll., 2014)

- la croissance et la reproduction
  - l'augmentation de l'hormone du stress est liée au déclin de la reproduction, ainsi qu'à une période larvaire abrégée et métamorphose hâtive (Michaels et coll., 2014b)
- la couleur et l'apparence de la peau
- le changement (p. ex. couleur, forme) de l'apparence normale des boulettes fécales chez les grenouilles et les salamandres

Les chercheurs devraient consulter la documentation et utiliser les indicateurs les moins invasifs pertinents aux animaux et à l'étude. Par exemple, l'écouvillonnage de la peau pour mesurer des hormones de stress (Santymire, 2018) peut être approprié dans certaines situations.

9.1.1 *Xenopus*

Les comportements typiquement observés chez les *Xenopus* en captivité sont décrits par Holmes et ses collègues (2016) et Chum ses collègues (2013). Holmes ses collègues (2016) fournissent un éthogramme permettant d'enregistrer le comportement de *Xenopus laevis*, qui comprend à la fois des comportements courants liés au mouvement et des comportements de courte durée liés à la respiration, à la nécrose de la peau et au déplacement par rapport à la paroi du bassin. Chum et ses collègues (2013) décrivent en détail l'apparence et l'activité physique d'un *Xenopus* en santé par rapport à un animal stressé ou en mauvaise santé.

Certains écarts par rapport au comportement normal peuvent justifier un examen, notamment une modification soudaine de l'activité physique (p. ex. léthargie ou nervosité), une incapacité à se nourrir correctement et une diminution des réflexes de redressement (Reed, 2005). Un changement d'apparence, comme une peau sèche et écaillée, excessivement gluante ou terne, ou encore la présence d'une hémorragie sous-cutanée (Reed, 2005; Tinsley, 2010), nécessite une attention particulière chez les *Xenopus* dont la peau est brillante et modérément gluante (Sive et coll., 2000, cité dans Reed, 2005; Tinsley, 2010). La mue est normale et joue un rôle dans le contrôle des infections chez le *Xenopus*, mais une trop grande quantité de peau morte dans le bassin (Tinsley, 2010) ou un changement dans l'intervalle entre les mues (Ohmer et coll., 2017) peut être un signe de problèmes liés au bien-être.

9.1.2 Axolotls

La couleur de la peau et la forme de la nageoire dorsale et de la queue sont des indicateurs importants du bien-être. Une peau qui semble avoir perdu sa couleur d'origine (c'est-à-dire comme si elle était recouverte d'un film) avec une nageoire dorsale ou une queue pliée et veinée indiquent des problèmes de santé.

10 PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

Principe directeur 18

La méthode la moins invasive et la mieux adaptée aux objectifs de l'étude doit être utilisée et tenir compte des répercussions possibles des procédures chez les amphibiens et des mesures à mettre en œuvre pour les réduire.

Comme pour d'autres espèces, les procédures ne devraient pas être effectuées dans les salles d'hébergement, sauf si elles sont très mineures, et des mesures devraient être prises pour réduire les répercussions possibles que les procédures peuvent avoir sur les autres amphibiens. D'après certaines études, les amphibiens peuvent être affectés par la production de phéromones d'alarme (p. ex. Fraker et coll., 2009).

Pour certains types de recherche, il est important de modifier les conditions environnementales par rapport à celles décrites dans les sections précédentes du présent document afin de provoquer artificiellement la métamorphose.

Le comité de protection des animaux de l'établissement doit examiner tous les protocoles prévoyant des procédures expérimentales (voir ACMAL, 2020). Pour les procédures courantes, le personnel qui travaille avec des animaux devrait pouvoir consulter des procédures normalisées de fonctionnement approuvées par le comité de protection des animaux afin d'assurer la cohérence des procédures et des soins aux animaux. Avant d'approuver et d'instaurer de nouvelles procédures normalisées de fonctionnement, celles-ci devraient être mises au point après consultation d'un expert et des parties intéressées (chercheurs et personnel en matière de sécurité et de soins aux animaux). Les procédures normalisées de fonctionnement devraient être mises à jour au fur et à mesure (CCPA, 2006). Toutes les procédures devraient être documentées et les registres devraient être conservés sous forme de fichiers électroniques ou sur place, à proximité des salles d'hébergement et de procédures, et mis à la disposition de l'équipe vétérinaire, du comité de protection des animaux et de l'unité de recherche.

Chaque établissement devrait avoir des politiques ou des procédures normalisées de fonctionnement pour les procédures fréquentes. Ces documents doivent être élaborés en tenant compte de la fréquence de répétition, de l'intervalle entre chacune et du nombre total de procédures effectuées au cours de la vie de l'animal. Les procédures normalisées de fonctionnement doivent également tenir compte de la douleur et de la détresse associées aux procédures ainsi que du caractère invasif et des répercussions des procédures sur le bien-être de l'amphibien à court et à long terme (CCPA, 1998).

On devrait éviter les procédures qui ont des effets nocifs sur les animaux lorsque d'autres méthodes efficaces permettent d'atteindre l'objectif de l'étude.

Toute procédure peut causer de la douleur ou de la détresse chez l'animal. De plus, la réalisation de nombreuses procédures courantes est plus compliquée chez les amphibiens en raison de leur petite taille. Cela étant, les procédures doivent être effectuées par des personnes compétentes et qualifiées; pour en savoir plus,

voir les *Lignes directrices du CCPA sur : la formation du personnel qui travaille avec des animaux en science* (CCPA, 2015). Dans la mesure du possible, elles sont confiées aux vétérinaires ou au personnel de soins aux animaux expérimentés.

Les solutions de raffinements continuent d'évoluer dans ce domaine en raison des avancées techniques. Les chercheurs, les vétérinaires et les comités de protection des animaux devraient évaluer toute nouvelle solution et en envisager la mise en œuvre.

Principe directeur 19

Les points limites doivent être établis et approuvés par le comité de protection des animaux avant le début de l'étude pour réduire le plus possible les effets négatifs des procédures expérimentales chez l'animal.

Dans le document *Lignes directrices du CCPA sur : choisir un point limite approprié pour les expériences faisant appel à l'utilisation des animaux en recherche, en enseignement et dans les tests* (CCPA, 1998), le terme « point limite » est défini comme suit : « 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 ». Le chercheur, en collaboration avec le vétérinaire, doit établir un programme de surveillance adéquat ainsi que des points limites appropriés pour la recherche (p. ex. amorce d'un traitement, cessation d'une procédure, euthanasie). Pour établir les points limites les plus précoces, on devrait consulter les principaux documents pertinents à la recherche menée.

Étant donné que les amphibiens ne présentent généralement pas les signes cliniques observés chez les animaux de laboratoire, il peut être difficile d'établir des points limites et d'interpréter la gravité d'une affection particulière d'après les signes présentés (Alworth et Harvey, 2007). Les indicateurs de bien-être, comme l'inappétence, les modifications de la peau, la rétention d'eau, les variations du poids corporel, la perte de mobilité et la concentration d'hormones de stress (voir la section 9, « Évaluation du bien-être animal »), peuvent servir à établir les points limites. Toutefois, les indicateurs liés aux comportements alimentaires et aux mouvements sont souvent difficiles à évaluer compte tenu de la faible mobilité et de l'alimentation irrégulière de nombreux amphibiens (Alworth et Harvey, 2007).

Des points limites pour les études de toxicité chez les larves d'amphibiens, notamment la grenouille *Xenopus laevis*, sont décrits dans les lignes directrices de l'OCDE pour les essais (OECD, 2014).

Si un modèle animal est en cours d'élaboration ou utilisé pour la première fois par le chercheur, des études pilotes devraient être menées pour établir les points limites.

Une fréquence de surveillance appropriée doit être établie en fonction du caractère invasif du protocole, des signes cliniques ou des manifestations attendues, de l'évolution de l'état de l'animal, du modèle animal et de chaque animal (selon ses antécédents). La surveillance devrait être documentée.

Ce suivi devrait être le fruit des efforts conjoints du personnel de recherche, de soins vétérinaires et de soins aux animaux. Le cas échéant et selon le caractère invasif du protocole, l'inclusion de plusieurs paramètres d'évaluation dans les feuilles de notation employées pour la surveillance est utile pour le suivi des points limites. Lors de l'évaluation du comportement d'un animal, il est important que les membres du personnel connaissent le comportement habituel afin de déceler tout écart.

Lorsque des stimuli douloureux ou dangereux sont perçus par un animal et que cet état ne peut être soulagé et n'est pas une composante du protocole de recherche approuvé par le comité de protection des animaux, l'animal doit être euthanasié dans les plus brefs délais.

10.1 MODÈLES ANIMAUX

Les amphibiens sont utilisés comme modèles animaux pour un large éventail d'études sur la physiologie (Burggren et Warburton, 2007) et l'écologie (Hopkins, 2007).

Les chercheurs et les directeurs d'études devraient d'abord déterminer si des amphibiens sont nécessaires pour l'étude et, dans l'affirmative, sélectionner l'espèce, la souche et l'étape du cycle de vie idéale comme modèle pour le processus biologique à l'étude. Le choix est motivé par des questions de disponibilité, de besoins particuliers, d'éthique et de bien-être de l'espèce, de souche et d'étape du cycle de vie de l'animal dans le cadre expérimental. On ne doit pas obtenir des souches ayant des exigences particulières en l'absence de mesures pour bien soigner ces animaux. Il peut être nécessaire de revoir la conception de certaines études si ces exigences présentent des difficultés pour le maintien de la santé et du bien-être des animaux ou sont accrues en conséquence des interventions expérimentales. Si nécessaire, les mesures requises peuvent faire appel à un savoir-faire technique particulier ou supplémentaire et un personnel hautement qualifié.

10.2 ADMINISTRATION DE SUBSTANCES

La voie d'administration dépend du type de substance (p. ex. solubilité dans l'eau). Chez les espèces aquatiques, l'immersion devrait être utilisée de préférence à d'autres voies si elle est appropriée pour la substance administrée. Les hormones peptidiques, entre autres, ne peuvent pas être administrées par immersion; elles sont à injecter. L'espèce et l'âge de l'animal ainsi que la substance administrée doivent être pris en considération pour toute administration par voie parentérale.

Chez les espèces terrestres, l'immersion peut être utilisée en raison de la perméabilité de leur peau (Kaufmann et Dohmen, 2016) et ciblée une partie du corps, notamment un membre. L'injection dans les sacs lymphatiques dorsaux est également appropriée pour administrer certaines substances chez les espèces terrestres.

10.2.1 *Xenopus*

En général, les substances injectées dans le sac lymphatique dorsal sont rapidement absorbées dans le sang (Reed, 2005). Le type de substance peut cependant avoir une influence sur la vitesse d'absorption. Par exemple, les substances liposolubles peuvent être moins efficaces en raison de la teneur élevée en lipides de la lymphe. Les substances peuvent également être injectées par voie intramusculaire dans la cuisse (Wolfensohn et Lloyd, 2003, cité dans Reed, 2005; Green, 2010) ou par voie intrapéritonéale (intracoelomique) alors que la grenouille est placée sur le dos (Wolfensohn et Lloyd, 2003, cité dans Reed, 2005; Green, 2010). L'article de Green (2010) fournit de l'information sur le calibre des aiguilles et les volumes appropriés à injecter.

10.2.2 Axolotls

L'immersion est souvent utilisée pour l'administration de petites molécules afin d'étudier les voies de transmission des signaux. Les substances peuvent également être injectées par voie sous-cutanée, intrapéritonéale ou intramusculaire.

10.3 PRÉLÈVEMENTS DE LIQUIDES CORPORELS OU DE TISSUS

10.3.1 Sang

Le prélèvement sanguin chez les amphibiens est difficile en raison de leur petite taille et de la difficulté d'accéder à leurs vaisseaux sanguins (Reed, 2005). Des anesthésiques devraient être utilisés selon les besoins pour immobiliser l'animal et limiter le stress, et des méthodes de visualisation des vaisseaux sanguins peuvent être nécessaires (Heatly et Johnson, 2009). Le choix d'aiguilles de taille appropriée est important pour réduire au minimum les traumatismes tissulaires (Heatly et Johnson, 2009).

Les principaux sites de prélèvement de sang chez les amphibiens comprennent la veine caudale ventrale et la veine abdominale ventrale; la ponction cardiaque est également utilisée bien que cette voie soit risquée pour l'animal, nécessite une anesthésie (Heatly et Johnson, 2009) et devrait être une procédure terminale. Le prélèvement sanguin par la veine faciale (maxillaire) ou musculo-cutanée chez les espèces de la famille des *Ranidae* est décrit comme peu invasif, cependant on doit veiller à ne pas perforer l'œil ou le tympan de l'animal (Forzán et coll., 2012). Chez les salamandres, le site le plus facile d'accès est la veine caudale ventrale (Gentz, 2007).

10.3.1.1 Prélèvement sanguin avec survie

Dans un seul échantillon, on peut généralement prélever jusqu'à 5 à 10 % du volume total de sang chez un amphibien sain ou 1 % de son poids corporel (Heatly et Johnson, 2009), mais un prélèvement sanguin chez un animal qui n'est pas en santé ne devrait pas dépasser la moitié de cette quantité (Wright, 2001a, cité dans Gentz, 2007).

On connaît peu de choses sur la fréquence des prélèvements sanguins chez les amphibiens. Par conséquent, cette procédure ne devrait pas être répétée à moins que cela soit absolument nécessaire à l'étude et approuvé par le comité de protection des animaux. Si des prélèvements multiples sont nécessaires, différents sites devraient être utilisés et le temps entre chaque prélèvement devrait permettre le remplacement du volume sanguin. Les animaux doivent être surveillés pour détecter les changements de comportement (léthargie), de couleur (pendant plus d'une heure) et du taux d'hydratation, ce qui peut indiquer qu'une trop grande quantité de sang a été prélevée. Une perte de sang trop importante peut causer un choc hypovolémique, entraînant une augmentation du rythme cardiaque, une sécheresse des muqueuses, une léthargie et, finalement, la défaillance de plusieurs organes et la mort.

10.3.1.1.1 Xenopus

Chez les *Xenopus*, les sites de prélèvement sanguin courants chez d'autres amphibiens (veine caudale, veine linguale, veine fémorale, veine abdominale) sont inaccessibles (Green, 2010). Couper la palmure peut fournir quelques gouttes de sang (0,5 ml au plus), mais cette procédure peut causer de la douleur et de la détresse et un anesthésique local devrait être utilisé (Wolfensohn et Lloyd, 2003, cité dans Reed, 2005). L'amputation d'un doigt ou d'un orteil ne devrait pas être effectuée, car elle peut causer de la douleur et une infection, et l'échantillon ainsi prélevé contient également du liquide lymphatique et du tissu (Green, 2010). Par conséquent, la technique la plus fiable pour le prélèvement sanguin est généralement une procédure terminale effectuée sous anesthésie (Green, 2010).

10.3.1.2 Prélèvement sanguin suivi d'une euthanasie

La ponction cardiaque sous anesthésie peut être utilisée pour des procédures terminales. Elle devrait alors être suivie d'une seconde procédure (p. ex. une surdose d'anesthésique ou une méthode physique d'euthanasie) avant la fin de l'anesthésie afin de s'assurer de la mort de l'animal (Reed, 2005).

10.3.2 Urine et fèces

Narayan et ses collègues (2013) décrivent une méthode de prélèvement d'urine chez les grenouilles qui consiste à tenir doucement la grenouille au-dessus d'un contenant stérile et à lui masser brièvement l'abdomen; la miction devrait se produire en moins d'une minute. Wright et Whitaker (2001) fournissent également des informations sur le prélèvement d'urine.

Les échantillons fécaux sont généralement recueillis après avoir nourri les grenouilles qui sont ensuite placées dans des récipients en plastique doublés de papier essuie-tout le temps nécessaire à la défécation (Whitaker, 2016).

Le lavage cloacal, décrit par Wright et Whitaker (2001), est couramment effectué pour recueillir des échantillons fécaux frais en vue d'une analyse microscopique. Il consiste à introduire une sonde en caoutchouc bien lubrifiée et de taille appropriée dans le cloaque, à injecter une petite quantité de chlorure de sodium avec une seringue de 1,0 ml fixée à l'autre extrémité de la sonde et à aspirer le contenu du cloaque (Nugent-Deal, 2011).

10.4 IMPLANTS

Le transpondeur (puce électronique) et l'étiquette en élastomère (marquage visible) sont des types d'implants pour identifier les amphibiens. Chez certaines espèces, des implants en gélatine imprégnées de protéines spécifiques sont greffés pour identifier les amphibiens danes les études sur la régénération des tissus (p. ex. Satoh et coll., 2015).

Des données révèlent que certains dispositifs implantés chez les grenouilles migrent et sont éliminés par la vessie (Divers et Stahl, 2019; Borrell, 2010). En outre, il a été démontré que le transpondeur intégré passif perturbe les bactéries protectrices sur la peau des grenouilles pendant les deux semaines qui suivent l'insertion, ce qui rend les animaux plus sensibles aux infections (Antwis et coll., 2014a). Il peut donc être préférable d'opter pour l'étiquette en élastomère pour identifier les animaux (Antwis et coll., 2014b).

10.5 PROCÉDURES CHEZ LES AMPHIBIENS GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉS

La sélection de la méthode pour produire de nouvelles lignées génétiquement modifiées devrait tenir compte des Trois R (et être choisie en fonction de son efficacité), comme réduire le nombre d'animaux requis pour la création et le maintien de chaque lignée et tenir compte de l'ensemble des effets sur le bien-être animal. Les procédures pour la production d'animaux génétiquement modifiés devraient être examinées par le comité de protection des animaux lors de l'examen des protocoles, en tenant compte de l'évolution rapide du domaine de la modification génétique et des progrès dans la recherche sur le bien-être animal. Les demandes de renouvellement de protocoles soumises au comité de protection des animaux devraient inclure un rapport du chercheur sur l'efficacité des méthodes utilisées pour produire de nouvelles souches, qui peut citer des articles publiés.

De bonnes technologies d'archivage contribuent à la réduction et au raffinement. L'efficacité de ces technologies peut varier selon l'espèce. On devrait donc faire appel à un expert dans ce domaine pour la production de nouvelles lignées.

Les amphibiens utilisés dans des procédures de modification génétique devraient être en bonne santé et avoir un comportement normal. Pour en savoir plus sur la modification génétique chez les amphibiens, voir les ressources mentionnées à l'annexe 1.

10.5.1 Prélèvement d'échantillons pour le génotypage

Le prélèvement d'échantillons devrait se faire selon la méthode la moins invasive pour obtenir la quantité et la qualité des tissus requis pour le génotypage. Dans la mesure du possible, les échantillons devraient également servir aux tests de réaction en chaîne par polymérase. Le recours à des méthodes plus invasives qui exigent le prélèvement de tissus à la queue, aux doigts ou aux orteils doit être justifié dans le protocole d'utilisation des animaux.

10.5.2 Phénotypage

Certaines procédures sont acceptables pour les animaux dont la génétique n'a pas été modifiée, mais ne le sont pas pour les amphibiens génétiquement modifiés qui présentent un phénotype modifié. Pour les animaux ayant une faible capacité d'adaptation au stress, il convient éventuellement de modifier la procédure, voire de l'éviter; cette remarque s'applique notamment au choix de la méthode de phénotypage.

Une fois le phénotype déterminé, toute information supplémentaire relative au bien-être des animaux devrait être communiquée au comité de protection des animaux le plus tôt possible. La transmission d'une lignée germinale stable ne garantit pas la stabilité du phénotype ou du bien-être; une modulation du phénotype peut se produire (p. ex. l'intervention de facteurs comme les effets liés à l'âge, au patrimoine génétique, à l'homozygotie, aux croisements avec d'autres lignées mutantes). Une surveillance adéquate s'impose tout au long de la vie de l'animal ou si le fond génétique est modifié.

Les chercheurs devraient prendre des mesures appropriées pour transmettre à leurs pairs toute l'information disponible sur le phénotype et le bien-être ainsi que sur les stratégies pour atténuer les problèmes liés aux différentes lignées génétiquement modifiées.

Les amphibiens génétiquement modifiés peuvent réagir différemment aux médicaments et aux aliments et, par rapport aux amphibiens dont la génétique n'a pas été modifiée, à un certain nombre de conditions expérimentales. Des différences de métabolisme peuvent être à l'origine de ces disparités qui sont particulièrement pertinentes dans le cadre de l'utilisation d'anesthésiques, d'essais de nouveaux médicaments ou d'études de toxicité.

10.6 IMAGERIE

Un programme d'imagerie doit être élaboré en collaboration avec le vétérinaire. Bien que les études ayant recours à l'imagerie peuvent réduire le nombre d'animaux requis, les méthodes d'imagerie imposent des manipulations qui peuvent être une source de stress pour l'animal. Voici des facteurs à considérer : injections multiples, anesthésie, manipulations, transport, conditions expérimentales (p. ex. fardeau tumoral ou intervention chirurgicale), jeûne (Hildebrandt et coll., 2008). Les amphibiens aquatiques devraient être bien

hydratés au cours de la procédure. Le plan établi devrait tenir compte du bien-être animal et de la validité des résultats d'imagerie.

En raison des répercussions importantes de chaque anesthésie sur la physiologie de l'animal, on devrait tenir compte du nombre d'images et de la fréquence du procédé. Entre chaque examen d'imagerie, il est très important de surveiller les animaux.

De plus, le programme d'imagerie devrait être élaboré par rapport aux résultats attendus d'une intervention ou en fonction de l'âge auquel un changement se produit.

Les équipements devraient être soigneusement nettoyés, désinfectés, rincés et essuyés après chaque utilisation pour éviter la contamination croisée, notamment si les équipements sont partagés.

10.7 ÉTUDES COMPORTEMENTALES

Les études comportementales des amphibiens portent entre autres sur l'accouplement et la parade nuptiale, les interactions sociales, les habitudes alimentaires, les préférences environnementales (p. ex. la couleur de fond du réservoir) et la relation prédateur-proie (surtout chez les larves). Il est essentiel d'habituer les amphibiens à leur milieu d'hébergement et de veiller à leur santé et à leur bien-être pour obtenir des résultats valables et interprétables de tout programme d'études comportementales.

Si possible, on devrait utiliser des gâteries pour motiver un animal; c'est-à-dire une récompense sous forme de nourriture plutôt qu'une punition. La stimulation négative, la privation ou la restriction des ressources devraient être utilisées seulement s'il n'y a pas d'autre méthode. Le recours à des méthodes comme les décharges électriques, les stimuli d'aversion ou les restrictions alimentaires dans le cadre d'une étude de motivation devrait être justifié auprès du comité de protection des animaux, et ces méthodes devraient être utilisées le moins longtemps possible et de la manière qui porte le moins atteinte à l'animal.

Les équipements devraient être soigneusement nettoyés, désinfectés, rincés et essuyés après chaque utilisation pour éviter la contamination croisée, notamment si les équipements sont partagés.

10.8 CONTRÔLE DE LA CONSOMMATION D'ALIMENTS ET DE LIQUIDES

Les études faisant appel au contrôle de la consommation d'aliments et de liquides nécessitent l'établissement de points limites (p. ex. pour l'état de la peau) et la surveillance étroite des animaux. La connaissance de chaque animal est essentielle, car les amphibiens ont des besoins très variés pour favoriser l'hydratation, l'alimentation et la digestion. Les amphibiens ne mangent pas aussi régulièrement que les animaux à sang chaud, et leur système digestif est considérablement différent. Les amphibiens soumis à des restrictions alimentaires devraient être surveillés de près pour détecter toute cachexie (perte de poids, dépérissement). Si la variation de poids d'un animal adulte atteint environ 10 %, la fréquence de surveillance devrait être augmentée.

10.9 PRÉLÈVEMENT D'OVOCYTES

Les animaux doivent être en bonne santé avant de planifier le prélèvement d'ovocytes, et il doit y avoir suffisamment de temps entre chaque prélèvement pour permettre à l'animal de se rétablir. Les établissements devraient limiter le nombre d'interventions et le fixer pour chaque animal en fonction de sa santé et de la qualité de ses œufs.

Les précautions générales pour les interventions chirurgicales s'appliquent, y compris l'anesthésie et l'analgésie (voir la section 10.11, « Intervention chirurgicale »). Dans la semaine qui suit l'intervention chirurgicale, les animaux devraient être surveillés afin de détecter toute inflammation excessive au site d'incision, déhiscence de suture ou anomalie comportementale indiquant une maladie (p. ex. changements dans l'appétit, apathie ou léthargie).

10.10 ANESTHÉSIE ET ANALGÉSIE

10.10.1 Anesthésie

Principe directeur 20

On doit utiliser des anesthésiques dans les procédures qui seront source de stimuli nocifs ou dans les cas où il y aura d'importantes manipulations qui seront vraisemblablement source de traumatismes et d'atteinte physiologique chez les amphibiens.

L'anesthésie désigne généralement un état causé par un agent extérieur et caractérisé par une inhibition du système nerveux menant à une perte de sensibilité et de fonction motrice. Avant d'effectuer une procédure potentiellement douloureuse chez un amphibien ou tout autre animal, il faut anesthésier l'animal; l'anesthésie est également requise si l'animal est simplement exposé à cette procédure (Mitchell, 2009). L'anesthésie est également de mise lors de certaines manipulations pour réduire le stress et les risques de lésions attribuables au comportement de fuite.

Principe directeur 21

Les amphibiens doivent être constamment surveillés pendant l'anesthésie, de l'induction à la récupération.

On devrait veiller à permettre aux animaux de maintenir leur température corporelle idéale pendant l'induction et la récupération. La période nécessaire à l'induction de l'anesthésie et au réveil après dépend de l'espèce, de l'étape du cycle de vie, de l'agent anesthésique, de la température et de la profondeur de l'anesthésie. La température ambiante influe sur la dose requise, et le tamponnage augmente la vitesse à laquelle les anesthésiques font effet. Certains produits chimiques provoquent une excitation juste avant l'anesthésie, et l'utilisation d'un tranquillisant en combinaison avec un agent anesthésique peut être indiquée. La plupart des informations disponibles sur les effets des anesthésiques chez les amphibiens concernent les animaux adultes. On doit donc être particulièrement prudent lors de l'administration d'anesthésiques chez les jeunes animaux en raison des différences dans le métabolisme d'un anesthésique et de la perméabilité de la peau (Goulet et coll., 2010).

L'induction et la récupération peuvent prendre plus de 30 minutes, et les animaux doivent être surveillés pendant tout ce temps pour éviter les noyades (Gentz, 2007). Pendant la récupération, les amphibiens devraient être dans de l'eau douce à une température adaptée à l'espèce. Les anoures et autres amphibiens sans branchies doivent en plus avoir les narines au-dessus de la surface de l'eau pendant l'induction et la récupération (Girling, 2013); par exemple, en penchant le réservoir pour que l'eau soit peu profonde à une extrémité. Le réveil est complet lorsque l'animal peut nager ou marcher normalement.

Lorsqu'un animal est anesthésié, les informations pertinentes, comme le type d'agent anesthésique, la méthode d'administration et toute complication ou préoccupation concernant le bien-être, doivent être documentées dans le registre des animaux. Wright et Whitaker (2001) fournissent des informations utiles sur l'anesthésie des amphibiens, y compris les protocoles d'anesthésie.

10.10.1.1 Anesthésiques

Le tricaïne méthanesulfonate (TMS ou MS222) est un anesthésique courant dans le cas des amphibiens. Cependant, il doit être tamponné et utilisé uniquement chez les animaux sains, à une dose calculée en fonction de l'espèce, de l'étape du cycle de vie et de la taille de l'animal. Bien qu'il existe différentes qualités de TMS, on devrait utiliser la préparation pour usage vétérinaire. L'immersion dans le TMS est la méthode d'administration de prédilection, mais l'injection peut convenir à certaines espèces et situations (Koustubhan et coll., 2013).

Les études expérimentales sur l'utilisation des anesthésiques locaux chez les amphibiens sont peu nombreuses, et peu évaluent leur efficacité (Chatigny et coll., 2017). La lidocaïne peut avoir le même effet anesthésique que le TMS; ces produits ont des propriétés similaires, mais l'administration de lidocaïne à des animaux anesthésiés avec le TMS ne leur apporte pas d'avantage supplémentaire. On doit veiller à ne pas administrer à l'animal une surdose d'agent anesthésique.

Dans une comparaison des effets anesthésiques de la benzocaïne et du TMS chez la salamandre *Ambystoma tigrinum nebulosum* adulte, terrestre ou aquatique, on a observé que la benzocaïne provoquait une anesthésie plus rapide, mais une récupération plus longue et variable (Crook et Whiteman, 2006).

Certaines études confirment l'efficacité de l'eugénol (Goulet et coll., 2010), mais l'eugénol de qualité pharmaceutique n'est pas disponible et cette substance n'est pas approuvée au Canada.

10.10.1.1.1 Immersion

La peau des amphibiens est très perméable; le trempage dans une solution d'anesthésique soluble est donc une méthode efficace pour anesthésier. L'absorption du produit est influencée par la surface corporelle et le poids de l'animal (Goulet et coll., 2010).

Comme le TMS en solution aqueuse est acide, cela provoque un stress chez l'animal et la majorité du produit n'est pas absorbée (Wright et Whitaker, 2001). Le TMS devrait donc être tamponné avec du bicarbonate de sodium (Gentz, 2007) ou un autre tampon approprié (p. ex. l'HEPES, le Tris base ou du phosphate de sodium). Wright et Whitaker (2001) et Girling (2013) fournissent les dosages et les procédures de tamponnage recommandés selon la concentration de TMS. La préparation devrait avoir un pH entre 7,0 et 7,4 (Gentz, 2007; Green, 2010; Reed, 2005).

Lors de l'utilisation d'une solution anesthésique, l'animal doit être retiré de la solution dès qu'il ne réagit plus au toucher des paupières et au pincement des orteils (Gentz, 2007). Lorsque les animaux anesthésiés sont maintenus hors de l'eau, ils devraient être mouillés pour permettre la respiration cutanée. Pour les interventions de longue durée, l'animal devrait soit être transféré dans une solution contenant la moitié de la concentration de la solution utilisée pour provoquer l'anesthésie, soit être aspergé avec la solution anesthésique pour s'assurer qu'il reste sous anesthésie.

La perte du réflexe de redressement indique une anesthésie légère; tandis que la perte du réflexe de retrait à une stimulation nociceptive indique une anesthésie profonde (Gentz, 2007). La fréquence cardiaque et la fréquence respiratoire doivent être surveillées pour déterminer la profondeur de l'anesthésie. Pour certaines espèces, la surveillance peut reposer sur l'observation (p. ex. chez les anoures, le plancher de la bouche bouge à chaque respiration et le battement du cœur peut être vu à travers la peau lorsque l'animal est sur le dos); pour d'autres espèces, elle requiert de l'équipement (p. ex. un oxymètre Doppler ou un électrocardiogramme). Si le rythme cardiaque indique une anesthésie trop profonde, l'animal doit être rincé avec de l'eau propre et bien oxygénée jusqu'à son réveil (Gentz, 2007).

Habituellement, les amphibiens récupèrent après l'immersion dans du TMS dans les 30 à 90 minutes après avoir été rincés à l'eau douce. Les solutions anesthésiques devraient être éliminées comme des déchets chimiques.

10.10.1.1.2 Injection

Des anesthésiques à injecter comme le propofol ont été utilisés chez diverses espèces de grenouilles (von Esse et Wright, 1999). Par contre, Green (2010) souligne que le propofol n'est pas une option sûre pour les *Xenopus*.

10.10.1.1.3 Hypothermie

L'anesthésie hypothermique n'est pas appropriée pour les amphibiens, car elle ne semble pas provoquer une perte de conscience rapide chez ces animaux et il est difficile de surveiller la profondeur de l'anesthésie (Martin, 1995). Dans certaines situations, le froid peut toutefois être approprié comme modalité complémentaire (Lillywhite et coll., 2017).

10.10.1.2 *Xenopus*

Le TMS tamponné est l'anesthésique le plus courant pour le *Xenopus* et peut être administré par immersion (300-500 mg/l d'eau) ou par injection (50-150 mg/kg) (Wolfensohn et Lloyd, 2003, cité dans Reed, 2005). Il a été démontré que l'immersion dans un TMS tamponné pendant 20 minutes permet une anesthésie efficace chez le *Xenopus laevis* pour les procédures de moins de 30 minutes à une concentration de 1 g/l, ou de 60 minutes à une concentration de 2 g/l (Lalonde-Robert et coll., 2012).

L'induction par TMS peut se faire en 5 minutes seulement (Reed, 2005) ou prendre de 10 à 20 minutes (Green, 2010). L'anesthésie est évaluée par la perte du réflexe de redressement, la perte du réflexe cornéen et la perte des réflexes de pincement des orteils (Green, 2010). On observe également une réduction de l'effort respiratoire, avec un ralentissement des mouvements de la gorge (Reed, 2005).

L'immersion dans un TMS tamponné est la méthode à privilégier pour les *Xenopus*; l'immersion dans la benzocaïne est une autre option (Smith et coll., 2018). Chez les *Xenopus*, certains autres anesthésiques utilisés sont seulement efficaces pour des interventions de courte durée (p. ex. l'application d'isoflurane topique) ou laissent les animaux sensibles à la douleur et ne conviennent que pour des interventions mineures (p. ex. la kétamine) (Reed, 2005). En outre, la réaction d'aversion et le risque de mortalité associés aux autres spécialités à base d'isoflurane laissent à penser que des informations supplémentaires sont nécessaires concernant son application topique (Reed, 2005). Certaines études confirment l'efficacité de l'eugénol (Goulet et coll., 2010), mais l'eugénol de qualité pharmaceutique n'est pas disponible et cette substance n'est pas approuvée au

Canada. Guénette et ses collègues (2013) examinent l'efficacité d'un certain nombre d'anesthésiques utilisés chez les grenouilles.

Comme indiqué précédemment pour tous les anoures, les *Xenopus* doivent avoir les narines au-dessus de la surface de l'eau pendant l'induction et la récupération.

10.10.1.3 Axolotls

Le TMS tamponné est couramment utilisé pour anesthésier les axolotls. Pour les interventions d'une durée de 15 à 30 minutes qui nécessitent une anesthésie, on peut utiliser l'immersion dans une solution de TMS à 0,2 % (soit 2 g/l) pendant 20 minutes (Zullian et coll., 2016). Une solution de TMS à 0,1 % ne produit pas d'anesthésie avec la même rapidité (Zullian et coll., 2016). Pour les procédures qui exigent une anesthésie prolongée, comme l'amputation d'un membre dans les études de régénération, une concentration de TMS entre 0,3 et 0,4 % peut être appropriée (Zullian et coll., 2016).

La profondeur de l'anesthésie peut être déterminée par le test du réflexe de retrait ou le test du réflexe de redressement (Zullian et coll., 2016).

Pendant la récupération, les axolotls devraient être surveillés en permanence et hébergés à une température ne dépassant à aucun moment 23 °C.

10.10.2 Analgésie

Principe directeur 22

Conformément au principe de précaution, on devrait recourir à l'analgésie sur les amphibiens avant de réaliser une procédure qui, selon les meilleures données scientifiques disponibles, risque d'être douloureuse.

L'analgésie est encouragée si on dispose des informations pertinentes. L'incapacité des observateurs à reconnaître les réactions nociceptives ou à détecter les signes de détresse ne devrait pas justifier le non-recours à l'analgésie.

En l'absence d'informations pertinentes sur les analgésiques, il peut y avoir des effets secondaires inconnus pour les animaux et des conséquences sur la recherche. Dans le cas des axolotls, on ne sait pas si l'analgésie interfère avec les études sur la régénération et si elle est avantageuse pour ces animaux qui ne démontrent pas les comportements généralement associés à la douleur ressentie après une amputation (p. ex. ils ont un comportement alimentaire normal et utilisent le membre amputé). Une étude a montré que la réaction comportementale des axolotls ayant reçus ou non une analgésie est la même pour les stimuli nocifs aigus (Llaniguez et coll., 2020), mais il faut poursuivre la recherche sur l'efficacité du régime analgésique.

On dispose de peu de renseignements sur l'analgésie chez les amphibiens. Stevens (2011) et Gentz (2007) ont cependant examiné des recommandations concernant l'utilisation de divers analgésiques chez certaines espèces. Il est important d'évaluer soigneusement le dosage. Par exemple, une faible dose de flunixine méglumine (25 mg/kg) produit une analgésie efficace chez les *Xenopus*, alors qu'une forte dose peut provoquer le décès (Smith et coll., 2018).

10.11 INTERVENTION CHIRURGICALE

Les amphibiens devraient être à jeun avant toute intervention chirurgicale; la durée de ce jeûne dépend de l'animal. Gentz (2007) recommande un jeûne d'au moins 4 heures pour les petits amphibiens, 48 heures pour les grands amphibiens insectivores et 1 semaine pour les amphibiens dont les proies sont des vertébrés entiers.

Les amphibiens doivent être bien hydratés pendant l'intervention chirurgicale. Les amphibiens aquatiques et semi-aquatiques devraient être placés dans l'eau une heure avant et y être maintenus au moins partiellement pendant toute l'intervention (Gentz, 2007).

La préparation en vue d'une intervention chirurgicale devrait comprendre un rinçage délicat ou un curage du champ opératoire avec une solution saline stérile. La peau des amphibiens ne doit pas être frottée; elle a des propriétés antibiotiques naturelles, ce qui réduit la nécessité de désinfecter le champ opératoire. Il n'est généralement pas conseillé d'utiliser une solution de chlorhexidine à 0,75 % (Gentz, 2007), sauf si nécessaire. On ne doit pas utiliser du savon, du détergent, de l'alcool isopropylique ou de l'iode.

Les pellicules adhésives ne doivent pas être utilisées (Gentz, 2007).

Des antibiotiques peuvent être nécessaires pour certains types d'interventions chirurgicales. On devrait toutefois, soigneusement peser le pour et le contre, et consulter un vétérinaire avant d'en utiliser. Chez les axolotls, certains antibiotiques peuvent inhiber les métalloprotéases matricielles qui sont essentielles pour une bonne cicatrisation des plaies.

10.12 SURVEILLANCE ET SOINS POST-INTERVENTION

Les amphibiens principalement aquatiques doivent être bien rincés et placés dans une eau exempte d'agent anesthésiant (Gentz, 2007). La température de l'eau devrait être la même que celle du milieu d'hébergement de l'animal ou plus fraîche, selon l'espèce et le contexte. Pour les axolotls ayant subi une intervention chirurgicale lourde, maintenir la température de l'eau à 4 °C pendant 40 heures peut aider à la récupération.

Si nécessaire, des liquides peuvent être administrés par voie sous-cutanée ou intracoelomique après une intervention chirurgicale (Gentz, 2007). Selon le type d'intervention et l'espèce, il peut également être nécessaire d'aider les animaux à s'alimenter (Gentz, 2007). Gentz (2007) suggère des formules liquides nutritionnelles pour les soins post-intervention chez les amphibiens, notamment les *Xenopus*.

Si une antibiothérapie est nécessaire, elle devrait être administrée selon les conseils du vétérinaire.

11 EUTHANASIE

Les principes directeurs généraux décrits dans les *Lignes directrices du CCPA sur : l'euthanasie des animaux utilisés en sciences* (CCPA, 2010) s'appliquent à l'euthanasie de tous les animaux en science. Cette section fournit des informations complémentaires sur l'euthanasie des amphibiens.

Principe directeur 23

L'euthanasie des amphibiens doit être effectuée par du personnel compétent, selon la méthode la moins invasive et la mieux adaptée à l'espèce, à l'étape du cycle de vie de l'animal et aux objectifs de l'étude.

Pour toutes les méthodes d'euthanasie chez les amphibiens, les exigences suivantes sont importantes :

- le personnel qui participe à la procédure doit avoir reçu une formation et être compétent pour effectuer cette procédure chez l'espèce visée et s'assurer de la mort de l'animal;
- l'équipement doit être entretenu et nettoyé avant et après emploi;
- les animaux doivent être surveillés pendant toute la procédure d'euthanasie, jusqu'à ce que la mort soit confirmée.
- les animaux incompatibles ne doivent pas être ensemble avant l'euthanasie;
- le stress causé par la manipulation devrait être réduit le plus possible.

Pour les amphibiens couramment utilisés, comme les *Xenopus* et les axolotls, l'AVMA recommande une méthode physique d'euthanasie réalisée chez l'animal sous anesthésie profonde (AVMA, 2020). Cependant, d'autres méthodes sont considérées comme acceptables, comme indiqué dans les sections ci-dessous. Peu importe la méthode employée, on devrait procéder à une seconde méthode pour s'assurer de la mort de l'animal, ce qui est difficile à confirmer chez les amphibiens (AVMA, 2020).

11.1 IMMERSION OU ADMINISTRATION D'UN AGENT TOPIQUE

Comme il est mentionné dans les *Lignes directrices du CCPA sur : l'euthanasie des animaux utilisés en sciences* (CCPA, 2010), l'immersion dans de la tricaïne méthanesulfonate tamponnée ou l'application topique de benzocaïne est acceptable pour l'euthanasie des amphibiens. À ce sujet, l'AVMA (2020) recommande une immersion prolongée (une heure) dans une solution de TMS tamponnée à une concentration entre 5 et 10 g/l. Quant au chlorhydrate de benzocaïne, elle peut être utilisée pour l'immersion dans une solution à une concentration supérieure à 250 mg/l ou pour l'application topique d'un gel sur le ventre, à une concentration de 7,5 ou 20 % selon l'espèce et la taille de l'animal (AVMA, 2020).

L'immersion des *Xenopus* dans une surdose de TMS est préférable, car cette méthode semble être une des moins stressantes pour ce genre d'amphibiens (Reed, 2005). Pour l'euthanasie de *Xenopus laevis*, il est nécessaire de placer l'animal dans un bain de TMS d'une concentration de 5 g/l pendant au moins une heure

(Torreilles et coll., 2009). Une autre option est l'application topique de benzocaïne à une concentration de 20 % sur le ventre de *Xenopus laevis*, ce qui entraîne la mort dans les 3 à 5 heures (Torreilles et coll., 2009). Pour les deux cas, la méthode devrait être suivie d'une méthode physique qui permet de s'assurer de la mort de l'animal.

11.2 MÉTHODE PAR INJECTION

Comme les amphibiens absorbent facilement les produits chimiques par la peau, l'euthanasie peut souvent être réalisée par immersion ou par voie topique, suivie d'une méthode physique. Toutefois, si une injection est nécessaire, cette voie est une méthode acceptable pour les grenouilles et les crapauds avec les agents suivants, comme mentionnés dans les *Lignes directrices du CCPA sur : l'euthanasie des animaux utilisés en sciences* (CCPA, 2010) : TMS tamponné, benzocaïne et barbituriques (voie sous-cutanée) dans le sac lymphatique.

L'injection par voie intraveineuse (dans la veine caudale ou la veine abdominale ventrale) est acceptable, mais peut être difficile à réaliser en raison de la petite taille des animaux et de la difficulté d'accès aux vaisseaux sanguins. Les voies intrapéritonéale et sous-cutanée (espace lymphatique, sac lymphatique) sont également acceptables (AVMA, 2020). Les doses appropriées et le temps nécessaire à la perte de conscience et à la mort dépendent de l'agent, de la voie d'administration, de l'espèce et de la taille de l'animal.

Pour les *Xenopus*, Gentz (2007) recommande une surdose de pentobarbital administrée par voie intracoelomique, par voie sous-cutanée dans le sac lymphatique ou encore par voie intracardiaque (sous anesthésie). La dose dépend de l'espèce; pour les *Xenopus laevis*, par exemple, Torreilles et ses collègues (2009) recommandent une injection intracoelomique de 1100 mg/kg de pentobarbital sodique avec de la phénytoïne sodique.

11.3 AGENTS ANESTHÉSIQUES INHALÉS

Les agents anesthésiques inhalés ne sont pas acceptables pour les *Xenopus* (Green, 2010), et ne sont pas habituellement efficaces pour les autres espèces d'amphibiens. Lorsque des anesthésiques à inhaler sont envisagés, un essai pilote devrait être mené chez les espèces d'intérêt pour comprendre l'efficacité et l'incidence de ces agents sur le bien-être animal.

Une surdose d'un anesthésique inhalé n'est pas appropriée pour les espèces qui retiennent leur souffle et qui sont donc résistantes à l'action de l'agent. Chez les autres espèces, la procédure doit être suivie d'une autre méthode pour s'assurer de la mort (CCPA, 2010). Certains agents à inhaler provoquent une excitation juste avant l'anesthésie, et certains ont des effets irritants ou nocifs chez l'animal (AVMA, 2020). En raison de la longue période d'exposition nécessaire pour obtenir la mort, une méthode physique d'euthanasie doit être appliquée après la perte de conscience.

11.4 MÉTHODES PHYSIQUES

Les lignes directrices de l'AVMA pour l'euthanasie des animaux (AVMA, 2020) recommandent que les amphibiens soient euthanasiés par une méthode physique lorsqu'ils sont sous anesthésie complète.

Pour les *Xenopus*, la décapitation d'un animal anesthésié est une méthode physique acceptable (Green, 2010). La décérébration est également acceptable si elle est précédée d'une immersion dans une solution de TMS ou d'une injection intracorporelle de TMS, suivie d'une décapitation comme méthode secondaire

(Green, 2010). La décapitation ou la décérébration sans anesthésie n'est pas acceptable (Reed, 2005), l'activité cérébrale pouvant se poursuivre pendant une période prolongée dans le cas de la décapitation.

Des méthodes similaires sont acceptables pour les axolotls anesthésiés (TMS puis décérébration ou décapitation).

11.5 AUTRES MÉTHODES

Lorsque les méthodes décrites ci-dessus ne peuvent pas être utilisées, on devrait consulter le vétérinaire pour choisir la méthode la plus appropriée.

Pour les animaux anesthésiés, l'abattage d'un coup violent sur la tête suivi d'une décérébration ou d'une décapitation chez l'animal inconscient est acceptable si les autres méthodes ne peuvent pas être utilisées (AVMA, 2020).

L'hypothermie et la congélation rapide ne devraient pas être utilisées comme méthode pour euthanasier les amphibiens sauf s'il y a une justification scientifique précise pour l'étude visée et que la procédure est approuvée par le comité de protection des animaux. Cependant, la congélation rapide dans l'azote liquide suivie d'une seconde méthode d'euthanasie pour s'assurer de la mort de l'animal peut être acceptable pour les individus pesant moins de 4 g et appartenant à une espèce qui ne peut pas survivre au gel (AVMA, 2020).

Sur le terrain, d'autres méthodes d'euthanasie peuvent être appropriées pour les amphibiens. En laboratoire, il est toutefois nécessaire de justifier le recours à une méthode autre que celles recommandées auprès d'un comité de protection des animaux et d'obtenir l'approbation par ce dernier.

11.6 EUTHANASIE DES LARVES

Les larves qui ne sont plus exclusivement tributaires de leur vitellus (alimentation exogène) sont couvertes par les présentes lignes directrices. En général, ces larves devraient être euthanasiées selon les mêmes méthodes que pour les adultes (AVMA, 2020), soit immersion dans une solution de TMS tamponnée suivie, si possible et en fonction de la taille des larves, d'une décérébration ou d'un coup violent sur la tête pour garantir la mort. La congélation des larves dans l'azote liquide est également une option. Seules les larves de grande taille devraient être anesthésiées au préalable, car les petites meurent rapidement après immersion dans l'azote liquide. En cas de doute, on devrait consulter le vétérinaire.

12 FIN DE L'ÉTUDE

12.1 TRANSFERT D'AMPHIBIENS ENTRE ÉTABLISSEMENTS OU PROTOCOLES

Voir la section 4, « Acquisition », pour tout savoir sur le transfert d'amphibiens à un autre établissement à la fin d'une étude, particulièrement en matière de réglementation, de registres et de transfert. Comme il y est mentionné, le transfert est possible si l'animal n'a pas subi de procédures invasives et est apte au transport.

Si l'animal est transféré à un établissement qui n'est pas certifié par le CCPA, l'expéditeur est responsable de s'assurer que le destinataire peut bien en prendre soin.

12.2 ADOPTION DES ANIMAUX

Dans la mesure permise par les autorités de réglementation, les particuliers qui ont les connaissances et la capacité de prendre soin d'amphibiens de laboratoire non modifiés génétiquement peuvent adopter des sujets sains comme animaux de compagnie auprès d'établissements qui souhaitent s'en départir. Aucun animal génétiquement modifié ne peut être mis en adoption. Les établissements devraient élaborer une politique adéquate qui décrit les conditions à remplir avant qu'un animal de laboratoire puisse être adopté comme animal de compagnie. Les établissements devraient s'assurer que les personnes qui adoptent des amphibiens de laboratoire connaissent les soins requis par ces animaux. Des registres devraient être tenus, et les nouveaux propriétaires devraient informer l'établissement si un animal présente une réaction tardive aux procédures de recherche et se conformer aux directives prévues par l'établissement dans un tel cas.

12.3 MISE EN LIBERTÉ

La libération d'animaux capturés en milieu naturel, y compris d'amphibiens, est traitée dans les *Lignes directrices du CCPA sur : le soin et l'utilisation des animaux sauvages* (CCPA, 2003b). La mise en liberté de tout animal doit respecter les lois et règlements fédéraux, provinciaux ou territoriaux et municipaux. En outre, il doit y avoir une évaluation des avantages et des risques à la fois pour l'animal mis en liberté et pour les animaux indigènes et des répercussions écologiques locales. Aucun amphibien génétiquement modifié en laboratoire ne peut être relâché dans la nature.

12.4 ÉLIMINATION DES ANIMAUX MORTS

Les carcasses d'amphibiens doivent être éliminées conformément aux règlements fédéraux, provinciaux ou territoriaux et municipaux qui encadrent l'élimination des matières biologiques.

13 SÉCURITÉ DES PERSONNES

Les établissements disposent de programmes de santé et de sécurité au travail qui visent expressément à encadrer la sécurité des personnes par l'évaluation des risques. Il est également de la responsabilité du comité de protection des animaux de vérifier que l'établissement possède un tel programme pour que les risques liés à la santé et à la sécurité des personnes soient bien évalués et communiqués à l'ensemble du personnel qui travaille avec les animaux.

Toute personne qui travaille avec des amphibiens doit respecter les politiques et les procédures normalisées de fonctionnement de l'établissement qui prévoient les mesures de prévention et de protection appropriées. Elle devrait aussi bien connaître les allergènes, les maladies d'origine animale et les autres risques associés à l'étude en question (exposition aux rayonnements, gaz anesthésiants, risques chimiques, lignées cellulaires humaines).

Les personnes qui travaillent avec des amphibiens devraient prendre les précautions nécessaires pour ne pas se faire mordre ou égratigner. Elles devraient également faire preuve de prudence lors de l'utilisation d'aiguilles ou d'autres instruments tranchants, car la petite taille des amphibiens peut accroître le risque de blessures chez la personne qui manipule l'animal.

Plusieurs agents pathogènes peuvent être transmis des amphibiens aux humains (zoonoses), comme la salmonelle, l'*Escherichia coli* et l'*Edwardsiella tarda*. Les protocoles de manipulation devraient prévoir le lavage des mains avant et immédiatement après la manipulation d'un animal.

Les sécrétions cutanées des *Xenopus* et de nombreux autres amphibiens sont toxiques. Les personnes qui travaillent avec ces animaux doivent donc s'assurer que les sécrétions n'entrent pas en contact avec leurs yeux (Tinsley, 2010). En outre, des gants en nitrile non poudrés peuvent protéger la peau du manipulateur et permettre d'éviter le contact avec ces sécrétions sans laisser de résidus ou d'irritants qui pourraient nuire aux animaux. Des lunettes de protection peuvent également être nécessaires pour travailler avec des espèces capables de projeter des toxines (p. ex. le crapaud géant, *Bufo marinus*) (Girling, 2013).

De nombreux amphibiens ont développé diverses stratégies adaptatives pour échapper à la prédation, notamment la production de toxines. Certaines espèces produisent des sécrétions toxiques alors que le poison d'autres amphibiens est d'origine exogène. En effet, des espèces comme les *Dendrobates* perdent leur toxicité lorsque, en captivité, ils ne peuvent pas se nourrir de proies elles-mêmes toxiques. Cependant, on devrait être prudent avec les animaux de source sauvage et il est important d'avoir une bonne connaissance de l'espèce.

Bien que les réactions allergiques aux amphibiens de laboratoire ne soient pas courantes, des précautions, comme le port de gants et le lavage des mains, devraient être prises, car il est possible de devenir sensible aux protéines des amphibiens (pour plus d'information, voir le feuillet *UC Davis Information Sheet on the Care and Use of Amphibians*).

Dans les installations qui hébergent des amphibiens, le sol est sujet à être mouillé, et les planchers glissants présentent un risque de chute pour le personnel. Des procédures normalisées de fonctionnement doivent être mises en place pour minimiser les risques posés par les planchers mouillés.

Le personnel qui manipule les bassins devrait avoir reçu une formation sur les méthodes ergonomiques de déplacement sécuritaire. Les bassins contenant de la terre ou de l'eau sont lourds et nécessitent une préparation adéquate avant leur déplacement. Par exemple, un aquarium rempli au moins au quart risque plus d'éclater en le déplaçant que si le niveau d'eau est plus bas.

Des précautions doivent également être prises lors de l'utilisation de produits chimiques comme le TMS, un irritant pour les yeux, la peau et les voies respiratoires. Cela comprend le respect des procédures normalisées de fonctionnement concernant la manipulation de ces produits, le port d'équipement de protection individuelle approprié et le travail sous une hotte de laboratoire lorsque cela est possible.

RÉFÉRENCES

Agence canadienne d'inspection des aliments – ACIA (2018) *Biosécurité à la ferme pour les cervidés : Guide de planification à l'intention des éleveurs*, Annexe 4 : Désinfectants sélectionnés (consulté le 14 juin 2021).

Alworth L.C. et Harvey S.B. (2007) IACUC issues associated with amphibian research. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 48(3):278-289.

American College of Veterinary Pathologists – ACVP (2020) *Ranavirus* (consulté le 14 juin 2021).

American Society of Ichthyologists and Herpetologists – ASIH (2004) *Guidelines for Use of Live Amphibians and Reptiles in Field and Laboratory Research* (consulté le 14 juin 2021).

American Veterinary Medical Association (2020) *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals* (consulté le 14 juin 2021).

Antwis R.E. et Browne R.K. (2009) Ultraviolet radiation and Vitamin D3 in amphibian health, behaviour, diet and conservation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 154(2):184-190.

Antwis R.E., Garcia G., Fidgett A.L. et Preziosi R.F. (2014a) Tagging frogs with passive integrated transponders causes disruption of the cutaneous bacterial community and proliferation of opportunistic fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 80(15):4779-4784.

Antwis R.E., Purcell R., Walker S.L., Fidgett A.L. et Preziosi R.F. (2014b) Effects of visible implanted elastomer marking on physiological traits of frogs. *Conservation Physiology* 2(1):cou042.

Armstrong J.B. et Malacinski G.M. (1989) *Developmental Biology of the Axolotl*. New York NY: Oxford University Press.

Association canadienne de la médecine des animaux de laboratoire – ACMAL (2020) *Normes de l'ACMAL sur les soins vétérinaires*. Toronto ON: CALAM (consulté le 14 juin 2021).

Ballinger R.E. (1973) Experimental evidence of the tail as a balancing organ in the lizard, *Anolis carolinensis*. *Herpetologica* 29(1):65-66.

Balls M. (1962) Spontaneous neoplasms in amphibia: A review and descriptions of six new cases. *Cancer Research* 22:1142-1154.

Bates K.A., Shelton J.M.G., Mercier V.L., Hopkins K.P., Harrison X.A., Petrovan S.O. et Fisher M.C. (2019) Captivity and infection by the fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* perturb the amphibian skin microbiome. *Frontiers in Microbiology* 10:1834.

Becker J.B., Arnold A.P., Berkley K.J., Blaustein J.D., Eckel L.A., Hampson E., Herman J.P., Marts S., Sadee W., Steiner M., Taylor J. et Young E. (2005) Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology* 146(4):1650-1673.

Bellairs A.d'A. et Bryant S.V. (1985) Autonomy and regeneration in reptiles. Dans: *Biology of Reptilia*, vol. 15 (Gans C.et Billett F., éd.), p. 301-410. New York NY: John Wiley & Sons.

Bliley J.M. et Woodley S.K. (2012) The effects of repeated handling and corticosterone treatment on behavior in an amphibian (Ocoee salamander: *Desmognathus ocoee*) *Physiology & Behavior* 105(5):1132-1139.

Borrell B. (2010) Frogs' secret disposal system revealed. *Nature* (consulté le 14 juin 2021).

Boyle D.G., Boyle D.B., Olsen V., Morgan J.A.T. et Hyatt A.D. (2004) Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 60(2):141-148.

Briggs R.W. (1941) Kidney stones in *Rana pipiens* tadpoles reared on spinach. *Science* 93(2411):256-257.

Browne R.K., Clulow J. et Mahony M. (2001) Short-term storage of cane toad (*Bufo marinus*) gametes. *Reproduction* 121(1):167-173.

Browne R.K., Odum R.A., Herman T. et Zippel K. (2007) Facility design and associated services for the study of amphibians. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 48(3):188-202.

Browne R.K., Pomering M. et Hamer A.J. (2003) High density effects on the growth, development and survival of *Litoria aurea* tadpoles. *Aquaculture* 215(1-4):109-121.

Browne R.K. et Zippel K. (2007) Reproduction and larval rearing of amphibians. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 48(3):214-234.

Browne R. (s.d.) Handling and injecting amphibians. *Amphibian Ark* (consulté le 14 juin 2021).

Burggren W.W. et Warburton S. (2007) Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 48(3):260-269.

Capshaw G. et Soares D. (2016) Hearing in plethodontid salamanders: A review. *Copeia* 104(1):157-164.

Centers for Disease Control and Prevention – CDC (2017) *Cleaning and Sanitizing with Bleach after an Emergency* (consulté le 14 juin 2021).

Chatigny F., Kamunde C., Creighton C.M. et Stevens E.D. (2017) Uses and doses of local anesthetics in fish, amphibians, and reptiles. *Journal of the American Associaton for Laboratory Animal Science* 56(3):244-253.

Chum H., Felt S., Garner J. et Green S. (2013) Biology, behavior, and environmental enrichment for the captive African clawed frog (*Xenopus* spp). *Applied Animal Behaviour Science* 143(2-4):150-156.

Cikanek S.J., Nockold S., Brown J.L., Carpenter J.W., Estrada A., Guerrel J., Hope K., Ibáñez R., Putman S.B. et Gratwicke B. (2014) Evaluating group housing strategies for the ex-situ conservation of harlequin frogs (*Atelopus* spp.) using behavioral and physiological indicators. *PLOS ONE* 9(2):e90218.

Conseil canadien de protection des animaux – CCPA (1998) *Lignes directrices du CCPA sur : choisir un point limite approprié pour les expériences faisant appel à l'utilisation des animaux en recherche, en enseignement et dans les tests*. Ottawa ON: CCPA (consulté le 14 juin 2021).

Conseil canadien de protection des animaux – CCPA (2003a) *Lignes directrices du CCPA sur : les animaleries – les caractéristiques, la conception et le développement*. Ottawa ON: CCPA (consulté le 14 juin 2021).

Conseil canadien de protection des animaux – CCPA (2003b) *Lignes directrices du CCPA sur : le soin et l'utilisation des animaux sauvages*. Ottawa ON: CCPA (consulté le 14 juin 2021).

Conseil canadien de protection des animaux – CCPA (2006) *Politique du CCPA sur : le mandat des comités de protection des animaux*. Ottawa ON: CCPA (consulté le 14 juin 2021).

Conseil canadien de protection des animaux – CCPA (2010) *Lignes directrices du CCPA sur : l'euthanasie des animaux utilisés en science*. Ottawa ON: CCPA (consulté le 14 juin 2021).

Conseil canadien de protection des animaux – CCPA (2015) *Lignes directrices du CCPA sur : la formation du personnel qui travaille avec des animaux en science.* Ottawa ON: CCPA (consulté le 14 juin 2021).

Conseil canadien de protection des animaux – CCPA (2017) *Lignes directrices du CCPA : les soins et la gestion des animaux en science*. Ottawa ON: CCPA (consulté le 14 juin 2021).

Conseil canadien de protection des animaux – CCPA (2021) *Lignes directrices du CCPA : l'évaluation du bien-être animal*. Ottawa ON: CCPA (consulté le 14 juin 2021).

Canadian Wildlife Health Cooperative - CWHC (2020) *Ranavirus* (consulté le 14 juin 2021).

Conseil de l'Europe (2003) *Revision of Appendix A of the Convention ETS 123 – Species specific provisions for amphibians: Background information for the proposals presented by the Group of Experts on Amphibians and Reptiles (Part B)* (ébauche, 7e réunion du groupe de travail). Strasbourg, France: Conseil de l'Europe.

Cooke G.M. (2018) Use of a translucent refuge for *Xenopus tropicalis* with the aim of improving welfare. *Laboratory Animals* 52(3):304-307.

Cramp R.L., McPhee R.K., Meyer E.A., Ohmer M.E. et Franklin C.E. (2014) First line of defence: The role of sloughing in the regulation of cutaneous microbes in frogs. *Conservation Physiology* 2(1):1-12.

Crook A.C. et Whiteman H.H. (2006) An evaluation of MS-222 and benzocaine as anesthetics for metamorphic and paedomorphic tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum nebulosum*). *The American Midland Naturalist* 155(2):417-421.

Delpire E., Gagnon K.B., Ledford J.J. et Wallace J.M. (2011) Housing and husbandry of *Xenopus laevis* affect the quality of oocytes for heterologous expression studies. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 50(1):46-53.

Densmore C.L. et Green D.E. (2007) Diseases of amphibians. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 48(3):235-254.

Denver R.J. (2019) Tadpole behavior and metamorphosis. Dans: *Encyclopedia of Animal Behavior* (Choe J.C., éd.), 2e éd., p. 514-518. Cambridge MA: Elsevier Academic Press.

Derickson W.K. (1976) Lipid storage and utilization in reptiles. *American Zoologist* 16:711-723.

Divers S.J. et Stahl S.J. (éd.) (2019) *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery,* 3e éd. St. Louis MO: Elsevier.

Duhon S.T. (2019) *Short Guide to Axolotl Husbandry*. Lexington KY: Ambystoma Genetic Stock Center.

Edholm E.-S. et Robert J. (2013) Recent research progress and potential uses of the amphibian *Xenopus* as a biomedical and immunological model system. *Resources* 2:167-183.

Elinson R.P. et del Pino E.M. (2012) Developmental diversity of amphibians. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology* 1(3):345-369.

Ferrie G.M., Alford V.C., Atkinson J., Baitchman E., Barber D., Blaner W.S., Crawshaw G., Daneault A., Dierenfeld E., Finke M., Fleming G., Gagliardo R., Hoffman E.A., Karasov W., Klasing K., Koutsos E., Lankton J., Lavin S.R., Lentini A., Livingston S., Lock B., Mason T., McComb A., Morris C., Pessier A.P., Olea-Popelka F., Probst T., Rodriguez C., Schad K., Semmen K., Sincage J., Stamper M.A., Steinmetz J., Sullivan K., Terrell S., Wertan N., Wheaton C.J., Wilson B. et Valdes E.V. (2014) Nutrition and health in amphibian husbandry. *Zoo Biology* 33(6):485-501.

Forbes D., Blom H.J.M., Kostomitsopoulos N., Moore G. et Perretta G. (2007) *Euroguide: On the Accommodation and Care of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes* (*Based on the Revised Appendix A of the European Convention ETS 123)*. Londres R.-U.: The Royal Society of Medicine Press Ltd.

Ford T.R., Dillehay D.L. et Mook D.M. (2004) Cutaneous acariasis in the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Comparative Medicine* 54(6):713-717.

Forzán M.J., Ferguson L.V. et Smith T.G. (2015) Calcium oxalate nephrolithiasis and tubular necrosis in recent metamorphs of *Rana sylvatica* (*Lithobates sylvaticus*) fed spinach during pre-metamorphic (tadpole) stage. *Veterinary Pathology* 52(2):384-387.

Forzán M.J., Vanderstichel R.V., Ogbuah C.T., Barta J.R. et Smith T.G. (2012) Blood collection from the facial (maxillary)/musculo-cutaneous vein in true frogs (family *Ranidae*). *Journal of Wildlife Diseases* 48(1):176-180.

Fox J.G., Anderson L.C., Otto G.M., Pritchett-Corning K.R. et Whary M.T. (éds.) (2005) *Laboratory Animal Medicine*, 3e éd., série American College of Laboratory Medicine. Cambridge MA: Elsevier Academic Press.

Fraker M.E., Hu F., Cuddapah V., McCollum S.A., Relyea R.A., Hempel J. et Denver R.J. (2009) Characterization of an alarm pheromone secreted by amphibian tadpoles that induces behavioral inhibition and suppression of the neuroendocrine stress axis. *Hormones and Behavior* 55(4):520-529.

Gabor C.R., Fisher M.C. et Bosch J. (2015) Elevated corticosterone levels and changes in amphibian behavior are associated with *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) infection and Bd lineage. *PLOS ONE* 10(4):e0122685.

Garcia T.S. et Sih A. (2003) Color change and color-dependent behavior in response to predation risk in the salamander sister species *Ambystoma barbouri* and *Ambystoma texanum*. *Oecologia* 137(1):131-139.

Gentz E.J. (2007) Medicine and surgery of amphibians. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 48(3):255-259.

Gilbert S.F. (2000) *Developmental Biology*, 6e éd. Sunderland MA: Sinauer Associates.

Girling S.J. (2013) *Veterinary Nursing of Exotic Pets*, 2e éd. Ames IA: Wiley-Blackwell.

Gomez-Mestre I., Touchon J.C. et Warkentin K.M. (2006) Amphibian embryo and parental defenses and a larval predator reduce egg mortality from water mold. *Ecology* 87(10):2570-2581.

Gosner K.L. (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologic*a 16(3):183-190.

Green S.L. (2010) *The Laboratory* Xenopus *sp.* (Suckow M.A., éd.) Boca Raton FL: CRC Press.

Goulet F., Hélie P. et Vachon P. (2010) Eugenol anesthesia in african clawed frogs (*Xenopus laevis*) of different body weights. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 49(4):460-463.

Guénette S.A., Giroux M.C. et Vachon P. (2013) Pain perception and anesthesia in research frogs. *Experimental Animals* 62(2):87-92.

Harrison R.G. (1969) Harrison stages and description of the normal development of the spotted salamander, *Amblystoma punctatum* (Linn). Dans: *Organization and Development of the Embryo* (Wilens S., éd.), p. 44-66. New Haven CT: Yale University Press.

Heatley J.J. et Johnson M. (2009) Clinical technique: amphibian hematology: A practitioner's guide. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18(1):14-19.

Heffner H.E. et Heffner R.S. (2007) Hearing ranges of laboratory animals. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 46(1):11-13.

Heyworth C. et Owens D. (2019) Eureka! Enhanced water recipe and enrichment for oocyte quality and embryo development in the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Laboratory Animal Science Professional* 7(1):43-45.

Hildebrandt I.J., Su H. et Weber W.A. (2008) Anesthesia and other considerations for *in vivo* imaging of small animals. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 49(1):17-26.

Hodl W. et Amézquita A. (2001) Visual signaling in anuran amphibians. Dans: *Anuran Communication* (Ryan M., éd.), chapitre 10, p. 121-141. Washington DC: Smithsonian Institution Press.

Holmes A.M., Emmans C.J., Jones N., Coleman R., Smith T.E. et Hosie C.A. (2016) Impact of tank background on the welfare of the African clawed frog, *Xenopus laevis* (Daudin). *Applied Animal Behaviour Science* 185:131-136.

Holmes A.M., Emmans C.J., Coleman R., Smith T.E. et Hosie C.A. (2018) Effects of transportation, transport medium and re-housing on *Xenopus laevis* (Daudin). *General and Comparative Endocrinology* 266:21-28.

Hopkins W.A. (2007) Amphibians as models for studying environmental change. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 48(3):270-277.

Hurney C.A., Babcock S.K., Shook D.R., Pelletier T.M., Turner S.D., Maturo J., Cogbill S., Snow M.C. et Kinch K. (2015) Normal table of embryonic development in the four-toed salamander, *Hemidactylium scutatum*. *Mechanisms of Development* 136:99-110.

Jiménez R.R. et Sommer S. (2017) The amphibian microbiome: natural range of variation, pathogenic dysbiosis, and role in conservation. *Biodiversity and Conservation* 26(4):763-786.

Joven A., Elewa A. et Simon A. (2019) Model systems for regeneration: Salamanders. *Development* 146(14):dev167700.

Kashiwagi K., Kashiwagi A., Kurabayashi A., Hanada H., Nakajima K., Okada M., Takase M. et Yaoita Y. (2010) *Xenopus tropicalis*: An ideal experimental animal in Amphibia. *Experimental Animals* 59(4):395-405.

Kaufmann K. et Dohmen P. (2016) Adaption of a dermal in vitro method to investigate the uptake of chemicals across amphibian skin. *Environmental Sciences Europe* 28(1):10.

Kerney R. (2011) Embryonic staging table for a direct-developing salamander, *Plethodon cinereus* (Plethodontidae). *The Anatomical Record* 294(11):1796-1808.

Khattak S., Murawala P., Andreas H., Kappert V., Schuez M., Sandoval-Guzmán T., Crawford K. et Tanaka E.M. (2014) Optimized axolotl (*Ambystoma mexicanum*) husbandry, breeding, metamorphosis, transgenesis and tamoxifen-mediated recombination. *Nature Protocols* 9(3):529-540.

Kikuyama S., Hasunuma I., Toyoda F., Haraguchi S. et Tsutsui K. (2009) Hormone-mediated reproductive behavior in the red-bellied newt. *Annals of the New York Academy of Science* 1163:179-186.

Kohman E.F. (1939) Oxalic acid in foods and its behavior and fate in the diet. *Journal of Nutrition* 18(3):233-246.

Koprivnikar J., Forbes M.R. et Baker R.L. (2008) Larval amphibian growth and development under varying density: Are parasitized individuals poor competitors? *Oecologia* 155(3):641-649.

Koustubhan P., Kaplan D.L. et Levin M. (2013) Humane anesthesia and pain management in amphibian limb surgery of *Rana pipiens. Cold Spring Harbor Protocols* 2013(2):149-155.

Kreger M.D. (2002) Comfortable quarters for amphibians and reptiles in research institutions. Dans: *Comfortable Quarters for Laboratory Animals* (Reinhardt V. et Reinhardt A., éd.). p.109-114. Washington DC: Animal Welfare Institute.

Kroll lab (2012) *Xenopus tropicalis* and *Xenopus laevis* environmental parameter standard operating procedure. Dans : *Xenopus Wiki: A Collaborative Resource for the Xenopus Community* (consulté le 14 juin 2021).

Kupfer A., Nabhitabhata J. et Himstedt W. (2004) Reproductive ecology of female caecilian amphibians (genus *Ichthyophis*): a baseline study. *Biological Journal of the Linnean Society* 83(2):207-217.

Kupfer A. (2007) Sexual size dimorphism in amphibians: An overview. Dans: *Sex, Size and Gender Roles: Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism*. (Fairbairn D.J., Blanckenhorn W.U. et Székely T., éd.), chapitre 5, p. 50-59. Oxford University Press.

Lalonde-Robert V., Beaudry F. et Vachon P. (2012) Pharmacologic parameters of MS222 and physiologic changes in frogs (*Xenopus laevis*) after immersion at anesthetic doses. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 51(4):464-468.

Lillywhite H.B., Shine R., Jacobson E., Denardo D.F., Gordon M.S., Navas C.A., Wang T., Seymour R.S., Storey K.B., Heatwole H., Heard D., Brattstrom B. et Burghardt G.M. (2017) Anesthesia and euthanasia of amphibians and reptiles used in scientific research: should hypothermia and freezing be prohibited? *BioScience* 67(1):53-61.

Llaniguez J.T., Szczepaniak M.A., Rickman B.H., Gelovani J.G., Hish G.A. et Cotroneo T.M. (2020) Quantitative and qualitative behavioral measurements to assess pain in axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 59(2):186-196.

Maginnis T.L. (2006) The costs of autotomy and regeneration in animals: A review and framework for future research. *Behavioral Ecology* 17(5):857-872.

Martin B.J. (1995) Evaluation of hypothermia for anesthesia in reptiles and amphibians. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 37(4):186-190.

McCarthy M.M., Arnold A.P., Ball G.F., Blaustein J.D. et De Vries G.J. (2012) Sex differences in the brain: the not so inconvenient truth. *Journal of Neuroscience* 32(7):2241-2247.

McDiarmid R. et Altig R. (éd.) (2000) *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. Chicago IL: University of Chicago Press.

McLean K.I., Stockwell C.A. et Mushet D.M. (2016) Cannibalistic-morph tiger salamanders in unexpected ecological contexts. *The American Midland Naturalist* 175(1):64-72.

McNamara S., Wlizla M. et Horb M.E. (2018) Husbandry, general care, and transportation of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Methods in Molecular Biology* 1865:1-17.

Michaels C.J., Downie J.R. et Campbell-Palmer R. (2014a) The importance of enrichment for advancing amphibian welfare and conservation goals: A review of a neglected topic. *Amphibian and Reptile Conservation* 8(1):7-23.

Michaels C.J., Gini B. et Preziosi R.F. (2014b) The importance of natural history and species-specific approaches in amphibian ex-situ conservation. *The Herpetological Journal* 24(3):135-145.

Mitchell M.A. (2009) Anesthetic considerations for amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18(1):40-49.

Morgan K.N. et Tromborg C.T. (2007) Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science* 102(3-4):262-302.

Mushinsky H.R. (1975) Selection of substrate pH by salamanders. *The American Midland Naturalist* 93(2):440-443.

Narayan E.J., Cockrem J.F. et Hero J.-M. (2013) Sight of a predator induces a corticosterone stress response and generates fear in an amphibian. *PLOS ONE* 8(8):e73564.

National Research Council – NRC (1974) *Amphibians: Guidelines for the Breeding, Care and Management of Laboratory Animals*. Washington DC: The National Academies Press.

Nieuwkoop P.D. et Faber J. (1967) *Normal Table of* Xenopus laevis (Daudin): *A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis*. Amsterdam, Pays-Bas: North-Holland Publishing Company.

Nugent-Deal J. (2011) Nursing techniques and diagnostic procedures for exotic animals (Proceedings) (site *dvm360*) (consulté le 14 juin 2021).

Nye H.L.D., Cameron J.A., Chernoff E.A.G. et Stocum D.L. (2003) Extending the table of stages of normal development of the axolotl: limb development. *Developmental Dynamics* 226(3):555-560.

O'Brien M.F., Justice W.S.M., Beckmann K.M., Denk D., Pocknell A.M. et Stidworthy M.F. (2017) Four cases of neoplasia in amphibians at two zoological institutions: Alpine newt *Ichthyosaura alpestris*, red-eyed tree frog *Agalychnis callidryas*, common frog *Rana temporaria* and Puerto Rican crested toad *Peltophryne lemur*. *International Zoo Yearbook* 51(1):269-277.

Odum R.A. et Zippel K. (2011) *Water Quality* (consulté le 14 juin 2021).

Ohmer M.E.B., Cramp R.L., White C.R. et Franklin C.E. (2015) Skin sloughing rate increases with chytrid fungus infection load in a susceptible amphibian. *Functional Ecology* 29(5):674-682.

Ohmer M.E B., Cramp R.L., Russo C.J.M., White C.R. et Franklin C.E. (2017) Skin sloughing in susceptible and resistant amphibians regulates infection with a fungal pathogen. *Scientific Reports* 7(1):3529.

Organisation de coopération et de développement économiques – OCDE (2015) *Essai n° 241 : Essai de croissance et de développement de larves d'amphibiens (LAGDA)*, série Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, Effets sur les systèmes biologiques (consulté le 14 juin 2021).

O'Rourke D.P. (2007) Amphibians used in research and teaching. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 48(3):183-187.

Poole T. (1997) Happy animals make good science. *Laboratory Animals* 31(2):116-124.

Poole V.A. et S. Grow (éd.) (2012) *Amphibian Husbandry Resource Guide*. Silver Spring MD: Association of Zoos and Aquariums.

Pough F.H. (2007) Amphibian biology and husbandry. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 48(3):203-213.

Reed B.T. (2005) Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog (*Xenopus laevis*). West Sussex R.-U.: RSPCA.

Russell A.P. et Watson S. (2000) A posthatching developmental staging table for the long-toed salamander, *Ambystoma macrodactylum krausei. Amphibia-Reptilia* 21(2):143-154.

Russell W.M.S. et Burch R.L. (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique.* Londres R.-U.: Special edition published by Universities Federation for Animal Welfare – UFAW, 1992.

Santymire R.M., Manjerovic M.B. et Sacerdote-Velat A. (2018) A novel method for the measurement of glucocorticoids in dermal secretions of amphibians. *Conservation Physiology* 6(1):coy008.

Sapsford S.J., Alford R.A. et Schwarzkopf L. (2015) Visible implant elastomer as a viable marking technique for common mistfrogs (*Litoria rheocola*). *Herpetologica* 71(2):96-101.

Satoh A., Mitogawa K. et Makanae A. (2015) Regeneration inducers in limb regeneration. *Development, Growth and Differentiation* 57:421-429.

Schoen A, Boenke M. et Green D.M. (2015) Tracking toads using photo identification and image-recognition software. *Herpetological Review* 46(2):188-192.

Schultz T.W et Dawson D.A. (2003) Housing and husbandry of *Xenopus* for oocyte production. *Lab Animal* (New York) 32(2):34-39.

Showell C. et Conlon F.L. (2009) Natural mating and tadpole husbandry in the western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Cold Spring Harbor Protocols* 2009(9):pdb.prot5292.

Silvy N.J. (éd.) (2012) *The Wildlife Techniques Manual*, vol. 1: Research; vol. 2: Management. Baltimore MD: John Hopkins University Press.

Simmons A.M. et Narins P.M. (2018) Effects of anthropogenic noise on amphibians and reptiles. Dans: *Effects of Anthropogenic Noise on Animals* (Slabbekoorn H., Dooling R., Popper A.N. et Fay R.R., éd.), collection Springer Handbook of Auditory Research 66, chapitre 7, p. 179-208. New York NY: Springer-Verlag.

Sirois M. (2015) *Laboratory Animal and Exotic Pet Medicine: Principles and Procedures*, 2e éd. (consulté le 14 juin 2021).

Smith B.D., Vail K.J, Carroll G.L., Taylor M.C., Jeffery N.D., Vemulapalli T.H. et Elliott J.J. (2018) Comparison of etomidate, benzocaine, and MS222 anesthesia with and without subsequent flunixin meglumine analgesia in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 57(2):202-209.

Song F., Li B. et Stocum D.L. (2010) Amphibians as research models for regenerative medicine. *Organogenesis* 6(3):141-150.

Stevens C.W (2011) Analgesia in amphibians: Preclinical studies and clinical applications. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice* 14(1):33-44.

Sugalski M.T. et Claussen D.L. (1997) Preference for soil moisture, soil pH, and light intensity by the salamander, *Plethodon cinereus*. *Journal of Herpetology* 31(2):245-250.

Tennessen J.B., Parks S.E. et Langkilde T. (2014) Traffic noise causes physiological stress and impairs breeding migration behaviour in frogs. *Conservation Physiology* 2(1):cou032.

Tinsley R. (2010) Amphibians, with special reference to *Xenopus*. Dans: *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals,* 8e éd. (Hubrecht R. et Kirkwood J., éd.) chapitre 48, p. 741-760. Hoboken NJ: Wiley-Blackwell.

Tobias M.L., Barnard C., O'Hagan R., Horng S.H., Rand M. et Kelley D.B. (2004) Vocal communication between male *Xenopus laevis*. *Animal Behaviour* 67(2):353-365.

Torreilles S.L., McClure D.E. et Green S.L. (2009) Evaluation and refinement of euthanasia methods for *Xenopus laevis. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 48(5):512-516.

Troïanowski M., Mondy N., Dumet A., Arcanjo et C. Lengagne T. (2017) Effects of traffic noise on tree frog stress levels, immunity, and color signaling. *Conservation Biology* 31(5):1132-1140.

Trudeau V.L., Somoza G.M, Natale G.S, Pauli B., Wignall J., Jackman P., Doe K. et Schueler F.W. (2010) Hormonal induction of spawning in 4 species of frogs by coinjection with a gonadotropin-releasing hormone agonist and a dopamine antagonist. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8:36.

Tsonis P.A. et Del Rio-Tsonis K (1988) Spontaneous neoplasms in amphibia**.** *Tumor Biology* 9(4):221-224.

University of California, Berkeley (2018) *Aquatic Frog Housing*.

Verschooren E., Brown R.K., Vercammen F. et Pereboom J. (2011) Ultraviolet B radiation (UV-B) and the growth and skeletal development of the Amazonian milk frog *(Trachycephalus resinifictrix)* from metamorphosis. *Journal of Physiology and Pathophysiology* 2(3):34-42.

Videlier M., Cornette R., Bonneaud C. et Herrel A. (2015) Sexual differences in exploration behavior in *Xenopus tropicalis*? *The Journal of Experimental Biology* 218(Pt 11):1733-1739.

Vieira W.A. et McCusker C.D. (2018) Regenerative models for the integration and regeneration of head skeletal tissues. *International Journal of Molecular Sciences* 19(12):3752.

Von Esse F.V. et Wright K.M. (1999) Effect of intracoelomic propofol in White's tree frogs, *Pelodryas caerulea*. *The Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 9(3):7-8.

Wack C.L., Ratay M.K. et Woodley S.K. (2013) Effects of corticosterone on locomotory activity in red-legged salamanders. *Herpetologica* 69(2):118-126.

Walke J.B. et Belden L.K. (2016) Harnessing the microbiome to prevent fungal infections: Lessons from amphibians. *PLOS Pathogens* 12(9):e1005796.

Warne R.W., Kardon A. et Crespi E.J. (2013) Physiological, behavioral and maternal factors that contribute to size variation in larval amphibian populations. *PLOS ONE* 8(10):e76364.

Wells K.D. (2007) *The Ecology and Behavior of Amphibians*. Chicago IL: University of Chicago Press.

Wells K.D. et Schwartz J.J. (2007) The behavioral ecology of anuran communication. Dans: *Hearing and Sound Communication in Amphibians* (Narins P.M., Feng A.S., Fay R.R. et Popper A.N., éd.), chapitre 3, p. 44-86. New York NY: Springer.

Wente W.H. et Phillips J.B. (2005) Microhabitat selection by the Pacific treefrog, *Hylaregilla*. *Animal Behaviour* 70(2):279-287.

Whitaker B.R. (2016) Clinical techniques in amphibians. Dans: *Merck Veterinary Manual* (consulté le 14 juin 2021).

Withers P.C., Hillman S.S. et Drewes R.C. (1984) Evaporative water loss and skin lipids of anuran amphibians. *Journal of Experimental Zoology* 232(1):11-17.

Wlizla M., Falco R., Peshkin L., Parlow A.F. et Horb M.E. (2017) Luteinizing hormone is an effective replacement for hCG to induce ovulation in *Xenopus*. *Developmental Biology* 426(2):422-448.

Wlizla M., McNamara S. et Horb M.E. (2018) Generation and care of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* embryos. *Methods in Molecular Biology* 1865:19-32.

Woodley S.K. (2014) Chemical signaling in amphibians. Dans: *Neurobiology of Chemical Communication* (Mucignat-Caretta C., éd.), chapitre 8, p. 255-284. Boca Raton FL: CRC Press.

Wright K.M. et Whitaker B.R. (2001) *Amphibian Medicine and Captive Husbandry.* Malabar FL: Krieger Publishing Company.

Yagi K.T. et Green D.M. (2016) Mechanisms of density-dependent growth and survival in tadpoles of Fowler's toad, *Anaxyrus fowleri*: Volume vs. abundance. *Copeia* 104(4):942-951.

Zullian C., Dodelet-Devillers A., Roy S. et Vachon P. (2016) Evaluation of the anesthetic effects of MS222 in the adult Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Veterinary Medicine* (Auckland N.Z.) 7:1-7.

ANNEXE 1
ESPÈCES COURAMMENT UTILISÉES EN LABORATOIRE ET AUTRES RESOURCES

ESPÈCES COURAMMENT UTILISÉES EN LABORATOIRE

Grenouilles

- *Lithobates catesbeianus (Rana catesbeiana)*, grenouille taureau
- *Lithobates (Rana) pipiens*, grenouille léopard
- *Lithobates (Rana) sylvatica*, grenouille des bois
- *Xenopus laevis* et *Xenopus (Silurana) tropicalis*

Crapauds

- *Anaxyrus americanus*, crapaud d'Amérique
- *Rhinella marina*, crapaud buffle

Salamandres

- *Ambystoma mexicanum*, axolotl
- *Ambystoma tigrinum*, salamandre tigrée
- *Notophthalmus viridescens*
- *Plethodon* spp.

Cécilies

AUTRES RESSOURCES

Biologie et histoire naturelle

Amphibiens

O'Rourke D.P. et Rosenbaum M.D. (2015) Biology and diseases of amphibians. Dans: *Laboratory Animal Medicine,* 3e éd. (Fox J., Anderson L., Otto G., Pritchett-Corning K. et Whary M., éd.), chapitre 18. Cambridge MA: Academic Press.

Wells K.D. (2007) *The Ecology and Behavior of Amphibians*. Chicago IL: University of Chicago Press.

Xenopus

Green S.L. (2009) *The Laboratory* Xenopus *sp*., 1ère éd. Boca Raton FL: CRC Press.

Axolotls

Armstrong J.B. et Malacinski G.M. (1989) *Developmental Biology of the Axolotl*. New York NY: Oxford University Press.

Hébergement, soins, gestion et élevage

Amphibiens

Wright K.M. et Whitaker B.R. (2001) *Amphibian Medicine and Captive Husbandry.* Malabar FL: Krieger Publishing Company.

Xenopus

Green S.L. (2009) *The Laboratory* Xenopus *sp*., 1ère éd. Boca Raton FL: CRC Press.

Sive H.L., Grainger R.M. et Harland R.M. (2000) *Early Development of* Xenopus laevis*: A Laboratory Manual*. Woodbury NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Axolotls

Farkas J.E. et Monaghan J.R. (2015) Housing and maintenance of *Ambystoma mexicanum*, the Mexican axolotl. *Methods in Molecular Biology* 1290:27-46.

Khattak S., Murawala P., Andreas H., Kappert V., Schuez M., Sandoval-Guzman T., Crawford K. et Tanaka E.M. (2014) Optimized axolotl (*Ambystoma mexicanum*) husbandry, breeding, metamorphosis, transgenesis and tamoxifen-mediated recombination. *Nature Protocols* 9(3):529-540.

Enrichissement et bien-être

Burghardt G.M. (2013) Environmental enrichment and cognitive complexity in reptiles and amphibians: Concepts, review, and implications for captive populations. *Applied Animal Behaviour Science* 147:286-298.

Kuppert S. (2013) Providing enrichment in captive amphibians and reptiles: Is it important to know their communication? *Smithsonian Herpetological Information Service* 142:1-42.

Michaels C.J., Downie J.R. et Campbell-Palmer R. (2014) The importance of enrichment for advancing amphibian welfare and conservation goals: A review of a neglected topic. *Amphibian & Reptile Conservation* (General Section) 8(1):7-23.

Morgan K.N. et Tromborg C.T. (2007) Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science* 102:262-302.

Xenopus

Holmes A.M., Emmans C.J., Coleman R., Smith T.E. et Hosie C.A. (2018) Effects of transportation, transport medium and re-housing on *Xenopus laevis* (Daudin). *General and Comparative Endocrinology* 266:21-28.

Santé et prévention des maladies

Amphibiens

O'Rourke D.P. et Rosenbaum M.D. (2015) Biology and diseases of amphibians. Dans: *Laboratory Animal Medicine*, 3e éd. (Fox J., Anderson L., Otto G., Pritchett-Corning K. et Whary M., éd.), chapitre 18. Cambridge MA: Academic Press.

Xenopus

Green S.L. (2010) *The Laboratory* Xenopus *sp*., 1ère éd. Boca Raton FL: CRC Press.

Procédures expérimentales

Amphibiens

Wright K.M. et Whitaker B.R. (2001) *Amphibian Medicine and Captive Husbandry.* Malabar FL: Krieger Publishing Company.

Xenopus

Green S.L. (2010) *The Laboratory* Xenopus *sp*., 1ère éd. Boca Raton FL: CRC Press.

Administration de substances et prélèvements

Axolotls

Debuque R.J. et Godwin J.W. (2015) Methods for axolotl blood collection, intravenous injection, and efficient leukocyte isolation from peripheral blood and the regenerating limb. *Methods in Molecular Biology* 1290:205-226.

Modification génétique

Xenopus

Sive H.L., Grainger R.M. et Harland R.M. (2000) *Early Development of* Xenopus laevis*: A Laboratory Manual*. Woodbury NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Salamandres

Kumar A. et Simon A. (éd.) (2015) *Salamanders in Regeneration Research: Methods and Protocols*. New York NY: Humana Press.

Axolotls

Armstrong J.B. et Malacinski G.M (1989) *Developmental Biology of the Axolotl*. Oxford R.-U.: Oxford University Press.

Fei J.F., Lou W.P., Knapp D., Murawala P., Gerber T., Taniguchi Y., Nowoshilow S., Khattak S. et Tanaka E.M. (2018) Application and optimization of CRISPR-Cas9-mediated genome engineering in axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Nature Protocols* 13(12):2908-2943.

Khattak S., Murawala P., Andreas H., Kappert V., Schuez M., Sandoval-Guzman T., Crawford K. et Tanaka E.M. (2014) Optimized axolotl (*Ambystoma mexicanum*) husbandry, breeding, metamorphosis, transgenesis and tamoxifen-mediated recombination. *Nature Protocols* 9(3):529-540.

Khattak S. et Tanaka E.M. (2015) Transgenesis in axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Methods in Molecular Biology* 1290:269-277.

Anesthésie, analgésie et intervention chirurgicale

Axolotls

Zullian C., Dodelet-Devillers A., Roy S. et Vachon P. (2016) Evaluation of the anesthetic effects of MS222 in the adult Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Veterinary Medicine* (Auckland N.Z.) 7:1-7.

Domaines particuliers de recherche – Régénération

Salamandres

Kumar A. et Simon A. (éd.) (2015) *Salamanders in Regeneration Research: Methods and Protocols*. New York NY: Humana Press.

ANNEXE 2
MÉTHODES D'IDENTIFICATION

MÉTHODE	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS	RÉFÉRENCES
INDIQUÉE			
Marquage naturel	• Non invasif • Économique • Utile si les animaux sont peu nombreux • Facilitée par la photographie numérique (p. ex. photos prises avec un téléphone intelligent)	• Distinction laborieuse si les animaux sont nombreux • Disparition des marques chez les animaux morts • Repérage difficile des marques chez les jeunes et les albinos • Identification difficile quand la couleur de la peau est affectée par le stress et la fluctuation des conditions ambiantes (éclairage, humidité, température) • Variation de l'apparence (p. ex. au fil du temps et d'une saison à l'autre, en fonction du milieu et de l'âge) • Coût lié au recours à un logiciel de reconnaissance d'images	Reed, 2005 Green, 2010 Schoen et coll., 2015
Implant d'élastomère visible	• Éprouvée pour les grenouilles et salamandres • Diverses possibilités pour l'injection, disponible en plusieurs couleurs • Petit volume permet une identification visible • Mieux adaptée aux petits animaux que beaucoup d'autres méthodes • Injection intraveineuse d'une étiquette alphanumérique à codage couleur	• Déplacement du marquage pouvant le faire disparaître • Faible visibilité du marquage chez certaines espèces compte tenu de la pigmentation de leur peau • Entreposage au froid jusqu'au moment de l'injection • Coûteux au début	Sapsford et coll., 2015 Antwis et coll., 2014

MÉTHODE	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS	RÉFÉRENCES
INDIQUÉE DANS CERTAINES CIRCONSTANCES			
Puces électroniques et transpondeurs	• Grand nombre d'individus identifiés • Efficace, pratique et fiable à vie chez la grenouille, et généralement sans effet indésirable • Puces peuvent être stérilisées puis réutilisées • Lésions tissulaires minimes au site d'insertion	• Impossible de distinguer les animaux à l'œil nu • Lecture du dispositif effectuée hors de l'eau en général • Repérage individuel des animaux difficile au sein de grands groupes • Risque (presque nul) de migration ou de perte de la puce • Risque d'ulcères ou réactions inflammatoires au site d'injection • Coûteuse • Pour certaines espèces (p. ex. les axolotls), possible seulement pour de grands nombre d'animaux hébergés pour l'élevage • Impossible pour les espèces de petite taille	Reed, 2005 Green, 2010
Étiquette en plastique fixée sur la patte (partie palmée) ou le dos	• Aucune complication à signaler en matière de santé ou de bien-être	• Nécessite une anesthésie • Peau et orteils palmés particulièrement fragiles car très vascularisés • Peut affecter la membrane muqueuse de la peau et augmenter le risque d'infection • Peut tomber, être ingérée par l'animal ou provoquer des symptômes de constriction chez ce dernier • Étiquette peut rester coincée (donc non recommandée pour les études sur le terrain)	Reed, 2005 Green, 2010
Injection d'une étiquette métallique codée		• Loupe nécessaire pour lire l'étiquette	
Marqueurs radioactifs	• Utile pour un grand nombre d'espèces d'amphibiens		Silvy, 2012

MÉTHODE	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS	RÉFÉRENCES
NON INDIQUÉE			
Cryomarquage	• Acceptable seulement dans le cas d'études sur le terrain pour lesquels il y a peu d'autres options	• Effets néfastes importants • Illisible après la mue (quelques mois ou un an) chez les grenouilles	Reed, 2005 Green, 2010
Tatouage		• Nécessite une anesthésie • Vibration de l'aiguille et sa pénétration à travers la peau, affectant ainsi la couche protectrice de mucus, peuvent prédisposer les animaux aux maladies • Tatouage à refaire fréquemment, soit après chaque mue • Ecchymoses, rougeurs et œdèmes visibles plusieurs jours après le tatouage	Reed, 2005 Green, 2010
Application d'acide acétique sur la peau		• Procédure douloureuse pour l'animal	Reed, 2005
Bague de patte		• Ajustement pour ne pas perdre la bague peut ralentir la circulation sanguine et entraîne un œdème et une nécrose	Reed, 2005
Amputation (doigts, orteils)		• Lésions, douleur; détresse possible • Peut nuire à la santé et à la survie à l'état sauvage • Repousse des doigts, notamment chez les axolotls	Reed, 2005
Greffe de peau		• Intervention chirurgicale sous anesthésie • Seulement pour un nombre limité d'animaux • Aucune information sur l'état de santé ou de bien-être; longévité du marquage inconnue • Système d'identification complexe	Reed, 2005

GLOSSAIRE

Acclimatation – Modification physiologique, biochimique ou morphologique durable, mais généralement réversible, qui apparaît chez un animal au cours de sa vie à la suite d'une exposition prolongée à un facteur environnemental comme une température élevée ou basse.

Analgésie – Diminution de la réaction à une stimulation nociceptive.

Anesthésie – Perte réversible de sensation et de fonction motrice provoquée par un agent anesthésique.

Animal sentinelle – Animal exempt de microorganismes pathogènes spécifiques que l'on sait vulnérable à un agent infectieux et que l'on place dans une zone potentiellement contaminée, par exemple lors de la livraison de nouveaux poissons en quarantaine; l'animal sentinelle est ensuite testé pour qu'on puisse vérifier s'il est infecté ou s'il a développé des anticorps en réaction aux agents infectieux.

Estivation – État de dormance qui se produit lorsque la temperature est trop élevée et l'humidité trop faible.

Amplexus – Mode d'accouplement par fécondation externe où le mâle s'accroche au dos de la femelle.

Asepsie – Absence de microorganismes, d'infection ou de putréfaction.

Bien-être – Santé physique et mentale de l'animal.

Chloramine – Nom générique pour des dérivés organiques formés lorsque du chlore et de l'ammoniac se combinent, souvent présents dans l'eau de source municipale.

Compétence – Étendue des capacités pour accomplir une tâche précise liée aux soins, à la gestion ou à l'utilisation des animaux, tout en veillant à ce que le bien-être animal soit protégé autant que possible malgré les contraintes imposées par toute étude approuvée et faisant appel à l'utilisation d'animaux; l'intérêt porté à la compétence plutôt qu'à la formation admet qu'il peut y avoir divers moyens d'acquérir les connaissances et les habiletés nécessaires, et met l'accent sur les résultats d'apprentissage – pour plus informations, voir les *Lignes directrices du CCPA sur : la formation des membres du personnel qui utilisent des animaux en science* (CCPA, 2015).

Congénères – Animaux appartenant à une même espèce.

Crypsis – Capacité d'un animal de se camoufler pour ne pas être repéré par d'autres animaux.

Détresse – État caractérisé par un déploiement, par l'animal, de ressources ou d'efforts importants pour s'adapter aux défis contextuels de son environnement; cet état, accompagné de douleur ou non, est associé à une procédure invasive, à une contention ou à toute autre situation dans laquelle le bien-être de l'animal est gravement compromis.

Douleur (chez les amphibiens) – Réaction à un stimulus nocif se manifestant par une modification du comportement ou de la physiologie, le même stimulus nocif étant également douloureux chez l'humain [définition provisoire].

Ectotherme – Qualifie un animal dont la température est variable suivant celle du milieu ambiant.

Enrichissement – Améliorations apportées à l'environnement de l'animal allant au-delà des besoins de base propres à l'espèce et bonifiant sa qualité de vie générale.

Équipement de protection individuelle (EPI) – Vêtement ou accessoire dont le personnel se sert pour se protéger contre un risque de blessure, d'infection ou de réaction allergique dans le cadre de travaux avec des animaux; exemples de dangers possibles : lésions (p. ex. morsures ou égratignures), contaminants, poussières en suspension dans l'air.

Fécondité – Caractère du sujet qui peut se reproduire.

Génétiquement modifié – Modification intentionnelle du génome, ensemble du matériel à l'origine des caractéristiques génétiques d'un organisme.

Génotypage – Détermination de l'ensemble des gènes (le génotype) d'un animal par l'analyse de la séquence de son ADN; cette analyse repose sur des essais biologiques et la comparaison avec la séquence d'un autre animal ou une séquence de référence.

Hypothermie – Abaissement au-dessous de la normale de la température du corps.

Intrapéritonéal (intracoelomique) – Relatif à la cavité péritonéale ou générale.

Ligne latérale – Chez certains amphibiens, organe sensoriel qui sert à percevoir le courant et les résistances de l'eau, ainsi que les vibrations.

Métamorphose – Transformations physiques depuis la larve jusqu'à l'adulte.

Microbiote – Ensemble des microorganismes présents dans un environnement (p. ex. microorganismes présents sur la peau d'un animal).

Morbidité – Manifestation observable d'un état de maladie.

Mortalité – Perte de la vie; mort.

Nociception – Communication par le système nerveux en réaction aux stimuli nocifs perçus par les nocicepteurs.

Ovocyte – Cellule immature de l'œuf des amphibiens.

Osmorégulation – Ensemble des processus homéostatiques qui interviennent dans la régulation de la concentration en sels dans les fluides biologiques d'un être vivant.

Pierre d'aération – Élément ajouté au système aquatique pour progressivement aérer l'eau.

Phénotype – Ensemble des caractéristiques physiologiques développées par un organisme et qui peuvent être observées (p. ex. apparence, comportement).

Point limite – Moment où la douleur ou la détresse d'un animal est arrêtée, minimisée ou diminuée lors d'une procédure, déterminé selon des critères qui tiennent compte du bien-être de l'animal (critère de bien-être) et de l'objectif de l'étude (critère d'effet scientifique).

Procédure normalisée de fonctionnement – Document qui décrit en détail la manière dont une procédure devrait être effectuée.

Quarantaine – Confinement des animaux qui pourraient être porteurs de maladies infectieuses, le temps nécessaire à leur évaluation.

Stimulus nocif – Agent capable de provoquer des réactions qui peuvent endommager les tissus.

Stress – État causé par des facteurs externes qui perturbe l'homéostasie chez un animal; le stress peut avoir des avantages (comme le déclenchement d'une réaction de fuite chez un animal menacé, ce qui l'aidera à s'adapter aux changements de son environnement); la prolongation de cet état peut cependant entraîner des changements endocriniens et réduire la capacité de l'animal à vivre avec les modifications de son environnement.

Torpeur – État d'inactivité souvent associé à une température corporelle basse et un métabolisme lent en réaction à un apport réduit de nourriture.

Trois R – Stratégies (c.-à-d. remplacement, réduction, raffinement) appliquées dans le domaine de la science faisant appel aux animaux, comme proposées par Russel et Burch dans *Principles of Humane Experimental Technique* (1959).

Vecteurs passifs – Objets inanimés (p. ex. vadrouilles) qui ont été contaminés et dont le contact est susceptible de propager l'agent pathogène.

Zoonotique – Relatif à la transmission d'une maladie d'un animal à un humain.