



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

*Liberté
Égalité
Fraternité*



**MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
ET DE L'ALIMENTATION**

*Liberté
Égalité
Fraternité*

Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale

(Articles R214-134 à 136 du Code rural et de la pêche maritime)

Membres du Comité (Arrêté du 02 juillet 2019)

Pierre Mormede (Président), Nicolas Guy, Françoise Médale, Valérie Nivet-Antoine, Michel Tarpin, Patrick Gonin, Sophie Picavet, Véronique Mary, Sylvie Duclaux, Bijan Ghaleh, Francine Behar-Cohen, Nicolas Dudoignon, Jean-Claude Desfontis, Emmanuel Picavet, Dominique Bourg, Sonia Desmoulin-Canselier, Gérard Raphaël Larrère, Sarah Bonnet, Jean-Claude Nouët, Patricia Lortic, Georges Chapouthier, Amélie Romain, Léa Briard.

Avis et recommandations sur le contrôle hydrique utilisé chez les primates non humains dans les projets scientifiques

Version 1 du 01/02/2021

Membres du groupe de travail

Amélie Romain (animatrice), Nicolas Guy, Raphaël Larrère, Patricia Lortic, Pierre Mormede, Virginie Vallet (MESRI), Sandryne Bruyas (MAA)

Ce document se compose de deux parties complémentaires

- Un avis concernant l'utilisation du contrôle hydrique chez les primates non-humains
- Des recommandations pour leur mise en œuvre (référentiel technique), élaborées en collaboration avec le GDR BioSimia

Avis sur le contrôle hydrique utilisé chez les primates non humains dans les projets scientifiques

Exposé des motifs

La distribution de boissons est utilisée comme renforcement positif dans les procédures de conditionnement opérant en apprentissage associatif chez les primates non humains. Dans ces protocoles, un contrôle hydrique peut être mis en place pour stimuler la motivation des sujets. Cette technique impliquant une restriction de l'accès « permanent » à la boisson altère de fait une exigence relative à l'hébergement des animaux prévue par la réglementation qui stipule que *tous les animaux doivent disposer en permanence d'eau potable non contaminée* (Directive 2010/63/UE - Annexe III [Section A - Art. 3.5.] ; Arrêté du 1^{er} février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs – Annexe II [section A - Art. 3.7]). De plus le contrôle hydrique d'un individu peut avoir des répercussions comportementales sur l'ensemble du groupe social auquel il appartient. En ce sens, cette technique pose un problème éthique au regard de son impact immédiat et à long terme sur le bien-être de l'animal concerné et de ses congénères.

La question posée est la suivante : Le contrôle hydrique chez les PNH est-il éthiquement acceptable et dans quelles conditions ?

Contexte

Certaines études, notamment les études lésionnelles, pharmacologiques, électro-physiologiques et d'imagerie cérébrale en neurosciences, comprennent des procédures de conditionnement opérant dans lesquelles il est demandé à l'animal de réaliser des tâches en échange d'une récompense qu'il aime, ce que l'on appelle un renforcement positif. Une tâche consiste en un enchaînement rapide d'essais récompensés en l'occurrence par un petit volume de liquide en cas de réponse correcte. En cas de réponse incorrecte, la récompense n'est pas délivrée mais aucune punition n'est utilisée. L'obtention de données statistiquement fiables et scientifiquement valides nécessite une grande stabilité des performances qui dépend du niveau de motivation de l'animal et donc de son intérêt pour la récompense. Si la récompense consiste à lui donner à boire, il faut qu'il ait suffisamment envie de se désaltérer au moment des tests pour être enclin à réaliser avec succès les tâches qui lui sont demandées.

L'enjeu du contrôle hydrique va donc consister à rationner les quantités de fluides que l'animal apprenant reçoit avant, pendant et après la session de travail journalière afin de créer une sensation de soif modérée qui stimulera sa motivation et son intérêt pour la récompense pendant la séance expérimentale. Toutefois, le contrôle hydrique est un outil motivationnel délicat à manipuler qui nécessite une très bonne connaissance des besoins individuels des animaux et une prise en compte de leur environnement car chaque individu a des besoins hydriques différents (Matsumoto, Akagi et Ochiai 1980 ; Stanley et Cramer 1968). Il faudra donc ajuster le rationnement hydrique de chaque animal apprenant en fonction de sa physiologie, afin de créer une sensation de soif homogène chez tous les sujets sans altération significative de leur bien-être. Le degré de contrôle hydrique nécessaire pour susciter un intérêt soutenu pour l'accomplissement de la tâche est lié à la difficulté de l'apprentissage et de l'exécution de la tâche (Toth et Gardiner 2000). Ainsi, en sus du type de récompense utilisée, le niveau de contrôle hydrique doit être ajusté en fonction des phases de l'étude et pour chaque individu.

Il a par ailleurs été démontré que le rationnement hydrique de certains animaux au sein d'une colonie en captivité induit des répercussions comportementales sur l'ensemble du groupe, susceptibles de créer des biais expérimentaux avec des effets délétères sur le bien-être des animaux (Prescott *et al.* 2010). Les risques de soif, de déshydratation, de perte de poids ou de retard de croissance ou d'inaptitude individuelle doivent être particulièrement suivis (Prescott *et al.* 2010).

Sur le plan éthique, il conviendra de suivre une méthodologie permettant d'évaluer l'impact global du contrôle hydrique sur le bien-être des animaux, à savoir ses effets immédiats et leurs conséquences éventuelles en termes de douleur, de souffrance, d'angoisse ou de dommages durables à mettre en balance avec les bénéfices scientifiques escomptés. Les limites éthiques sont alors appréciées en fonction du contexte scientifique et des conditions de mise en œuvre de la technique.

Etat des lieux des pratiques

La méthodologie utilisée et les indicateurs de suivi sélectionnés sont des facteurs déterminants pour limiter l'impact négatif sur le bien-être des animaux (Prescott *et al.* 2010 ; Veterinarians 2000 ; Toth et Gardiner 2000). Une revue bibliographique de 2016 (Gray) indique une diversité méthodologique tant en termes de type de récompense utilisée (eau, jus de fruit), de durée du contrôle hydrique (planning hebdomadaire variable) que de distribution et d'accessibilité de la ration hydrique (pendant et/ou hors session de travail, lors de la distribution alimentaire, etc.). Ces facteurs peuvent pourtant avoir des effets délétères sur le bien-être des primates (Prescott *et al.* 2010 ; Gray 2016). Certaines études décrivent des protocoles de contrôle hydrique sans effets délétères, qu'ils soient physiologiques ou comportementaux – néanmoins les effets à long terme ne sont pas toujours connus (Gray *et al.* 2016 ; Hage *et al.* 2014 ; Pfefferle *et al.* 2018).

Cette revue bibliographique a mis en lumière des discordances en termes de raffinement des méthodes :

- *Manque de précision quant à la procédure expérimentale réalisée* : variété des récompenses, des conditions (préférences individuelles, nombres d'essais, ajustement, etc.) et du suivi réalisé (suivi du poids, mesures physiologiques, suivi comportemental, gestion des groupes sociaux).
- *Effets ressentis par les animaux* : en dehors de l'impact physiologique, les impacts psychologiques et l'expérience subjective des animaux soumis au contrôle hydrique restent non évalués (Gray 2016). Les changements de comportement observés chez des primates en contrôle hydrique peuvent être indicatifs d'une diminution du bien-être, et des recherches supplémentaires sont nécessaires sur l'effet comportemental et psychologique de ces protocoles (Prescott et Lidster 2017).
- *Contrôle alimentaire vs contrôle hydrique* : il existe des méthodologies de renforcement alimentaire avec contrôle alimentaire associé. Cependant, il n'existe pas actuellement de comparaison de données sur les performances d'apprentissage, la durée totale de l'acquisition des données et sur l'état de santé et de bien-être entre les primates en contrôle alimentaire et ceux en contrôle hydrique. Le choix de ces méthodologies est dépendant des contraintes expérimentales.

Recommandations existantes

Plusieurs institutions, tels le NC3Rs (Royaume-Uni) et l'*Association of Primate Veterinarians* (USA), ont reconnu la nécessité du contrôle hydrique en réponse à des besoins scientifiques précis et limités, et ont émis en conséquence des recommandations pour encadrer le recours au contrôle hydrique (Prescott *et al.* 2010), en soulignant toutefois l'impossibilité de recommander une méthodologie spécifique de contrôle hydrique par rapport à une autre en raison du manque de données publiées sur les bénéfices et dommages relatifs au bien-être des animaux selon les méthodologies utilisées (Prescott *et al.* 2010).

Recommandation :

Considérant :

Que certains objectifs scientifiques dont les bénéfices escomptés sont supérieurs aux dommages causés nécessitent de mettre en place un contrôle hydrique,

Que dans l'état actuel des connaissances, quelle que soit la méthodologie utilisée, un impact sur le bien-être de l'animal concerné et de ses congénères est avéré ou ne peut pas être exclu,

Le Comité émet l'avis suivant :

- Le contrôle hydrique doit être évité dans la mesure du possible, en favorisant la motivation des animaux par d'autres méthodes de récompense, ayant un moindre impact sur leur bien-être tout en permettant d'atteindre des résultats comparables.
- La nécessité du contrôle hydrique doit être dûment justifiée par les bénéfices escomptés et après une évaluation dommages (pour les animaux) / avantages (pour le projet).
- Les facteurs à intégrer dans l'évaluation des dommages lors de la mise en place du contrôle hydrique doivent prendre en compte l'animal directement impliqué, son environnement physique et social, mais également l'impact potentiel sur les autres animaux présents dans le même groupe, pendant et après la procédure.
- Si le contrôle hydrique doit être mis en place pour atteindre les objectifs scientifiques, le demandeur doit se conformer au référentiel technique proposé en annexe et une description détaillée de la procédure expérimentale doit être portée à la connaissance du comité d'éthique.
- Les points suivants seront particulièrement évalués :
 - Choix de la méthode d'apprentissage (renforcement positif)
 - Mise en place d'un ajustement régulier du contrôle hydrique, de façon individuelle et en fonction des phases de l'étude.
 - Mise à disposition de l'eau de façon systématique lorsque l'animal reçoit sa ration alimentaire.
 - Suivi comportemental et suivi vétérinaire pour chaque animal inclus dans l'étude, et pour tout autre animal impacté par cette procédure pendant l'étude et après l'étude.
 - Définition des points limites proposés par les expérimentateurs (performances lors de la tâche, mesures comportementales, mesures physiologiques, etc.)

Références

- Gray HE, Bertrand H, Mindus C, Flecknell P, Rowe C, Thiele A. 2016. Physiological, behavioral, and scientific impact of different fluid control protocols in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*). *eNeuro* 3 (4): 1–15. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0195-16.2016>.
- Gray HE. 2016. The impact of fluid restriction protocols on rhesus macaques (*Macaca mulatta*) and refinements to their use. Thèse de doctorat, Newcastle University. <https://theses.ncl.ac.uk/jspui/bitstream/10443/3564/1/Gray%2c%20H.E.%202016.pdf>
- Hage SR, Ott T, Eiselt AK, Jacob SN, Nieder A. 2014. Ethograms indicate stable well-being during prolonged training phases in rhesus monkeys used in neurophysiological research. *Laboratory Animals* 48 (1): 82–87. <https://doi.org/10.1177/0023677213514043>
- Matsumoto K, Akagi H, Ochiai T. 1980. Comparative blood values of *Macaca mulatta* and *Macaca fascicularis*. *Experimental Animals* 29 (3): 325–40.
- Pfefferle D, Plümer S, Burchardt L, Treue S, Gail A. 2018. Assessment of stress responses in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) to daily routine procedures in system neuroscience based on salivary cortisol concentrations. *PLoS ONE* 13 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190190>.
- Prescott MJ, Brown VJ, Flecknell PA, Gaffan D, Garrod K, Lemon RN, Parker AJ *et al.* 2010. Refinement of the use of food and fluid control as motivational tools for macaques used in behavioural neuroscience research: Report of a Working Group of the NC3Rs. *Journal of Neuroscience Methods* 193 (2): 167–88. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.09.003>.
- Prescott MJ, Lidster K. 2017. Improving quality of science through better animal welfare: the NC3Rs strategy. *Laboratory Animals* 46 (4): 152–56. <https://doi.org/10.1038/labam.1217>.
- Stanley R.E, Cramer MB. 1968. Hematologic values of the monkey (*Macaca mulatta*). *American Journal of Veterinary Research* 29: 1041–47.
- Toth LA., Gardiner TW. 2000. Food and water restriction protocols: physiological and behavioral considerations. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* 39 (6): 9–17.

Liens

- Association of Primate Veterinarians Scientific Advisory Committee Guidelines (US)
<https://www.primatets.org/guidance-documents>
- The National Centre for the 3Rs (UK)
<https://www.nc3rs.org.uk/refining-food-and-fluid-control-behavioural-neuroscience-macaques>

Référentiel technique sur la mise en œuvre d'un contrôle hydrique dans les protocoles scientifiques chez les primates non-humains

Elaboré en collaboration avec le GDR BioSimia

Table des matières

1. Nécessité du contrôle hydrique.....	7
2. Informations à fournir dans le protocole	7
3. Apprentissage par renforcement positif.....	7
4. Mise en place progressive du contrôle hydrique	9
5. Contrôle hebdomadaire et période de repos	9
6. Ration minimale garantie	9
7. Ajustement individuel par singe : ration de référence et ration de travail	10
8. Suivi de la ration de travail	10
9. Suivi de l'état de santé et du bien-être des animaux pendant les périodes de contrôle hydrique	11
10. Suivi vétérinaire spécifique au contrôle hydrique	12
11. Définition des points limites.....	12
12. Gestion des mauvaises performances lors du contrôle hydrique.....	13
13. Arrêt progressif du contrôle hydrique	13
14. Contrôle hydrique en cas d'anesthésie générale.....	13

Introduction

La distribution de boissons peut être utilisée comme renforcement positif dans les procédures de conditionnement opérant en apprentissage associatif chez les primates non humains. Certains protocoles, afin de répondre à des besoins scientifiques précis et limités, peuvent inclure la mise en œuvre d'un contrôle hydrique afin de stimuler la motivation des sujets. Le contrôle hydrique peut simplement consister en une restriction du libre accès quotidien à l'eau (e.g. 1 h à 3 h par jour) et/ou impliquer un contrôle du volume de liquide ingéré par jour. Dans les deux cas, cela peut conduire à une diminution de la quantité totale ingérée, selon les individus et les protocoles utilisés. Ainsi, quel que soit le type de contrôle hydrique mis en place, un suivi de l'état de santé et du bien-être des animaux doit être réalisé, pendant et après la mise en place.

Plusieurs institutions, telles l'*Association of Primate Veterinarians* (USA) et le NC3Rs (Royaume Uni), ont émis en conséquence des recommandations pour encadrer le recours au contrôle hydrique. La méthodologie utilisée et les indicateurs de suivi sélectionnés sont des facteurs déterminants pour limiter l'impact négatif sur le bien-être des animaux (Prescott *et al.* 2010 ; Association of Primate Veterinarians 2014). Ces informations sont synthétisées dans le présent document.

1. Nécessité du contrôle hydrique

La mise en œuvre d'un protocole de contrôle hydrique est réalisée en réponse à un objectif scientifique précis (par exemple études lésionnelles, pharmacologiques, électro-physiologiques et d'imagerie cérébrale en neurosciences). Cet objectif doit être défini précisément et doit être évalué dans une démarche d'évaluation éthique dommages / avantages afin de justifier de la nécessité du contrôle hydrique.

2. Informations à fournir dans le protocole

Le choix d'un protocole doit tenir compte à la fois du bien-être animal et des objectifs scientifiques. Les facteurs à intégrer dans l'évaluation des dommages lors de la mise en place du contrôle hydrique doivent prendre en compte l'animal directement impliqué, son environnement physique et social, mais également l'impact potentiel sur les autres animaux présents dans le même groupe, pendant et après la procédure. Le protocole doit être justifié dans la demande d'autorisation de projet et décrit en détail, et doit inclure les éléments suivants :

- Choix de la méthode d'apprentissage ;
- Utilisation du contrôle hydrique : durée, planning, accès à la boisson hors session de travail, procédure d'ajustement régulier du contrôle hydrique, de façon individuelle et en fonction des phases de l'étude ;
- Mise à disposition de l'eau de façon systématique lorsque l'animal reçoit sa ration alimentaire. Si cela ne peut être mis en pratique pour des raisons vétérinaires, scientifiques ou liées au bien-être des animaux, les chercheurs doivent le spécifier et le justifier lors de la demande d'autorisation de projet ;
- Suivi comportemental et suivi vétérinaire pour chaque animal inclus dans l'étude, et pour tout autre animal impacté par cette procédure pendant et après l'étude ;
- Définition des points limites proposés par les expérimentateurs et grilles d'évaluation correspondantes (performances lors de la tâche, mesures comportementales, mesures physiologiques, etc.).

Le protocole détaillé doit également être présenté à la structure chargée du bien-être animal (SCBEA) de l'établissement.

Toutes les pratiques et les procédures scientifiques ayant recours au contrôle hydrique doivent faire l'objet d'une réflexion et d'un raffinement constant. Les techniques et les méthodes de motivation doivent être facilement accessibles dans la littérature afin que chaque équipe puisse continuer à raffiner les procédures.

3. Apprentissage par renforcement positif

L'apprentissage (ou « *training* ») basé sur le renforcement positif, qui permet de former les primates à coopérer avec le personnel de l'animalerie, a des avantages importants pour le bien-être des animaux mais également pour le personnel et la qualité des résultats scientifiques (Buchanan-Smith *et al.* 2009). Le training est recommandé comme bonne pratique dans de nombreux textes législatifs et directives professionnelles (NC3Rs 2017). Ces effets positifs sont d'autant plus mesurables qu'ils sont combinés avec une habitude à l'humain et une socialisation appropriée (Prescott *et al.* 2003). Enfin, dernier point soulevé par McMillan et collègues (2017), l'utilisation de méthodes non stressantes pour l'animal permet

aussi au personnel d'être moins stressé et d'impliquer l'équipe de recherche dans l'entraînement des primates, favorisant ainsi une meilleure atmosphère de travail.

Au contraire, l'utilisation de méthodes à conditionnement négatif pour l'animal telle que la privation de nourriture et/ ou d'eau pendant une durée longue n'est pas acceptable sur le plan éthique. L'animal est en situation de stress sur une période relativement longue, ce qui peut entraîner chez lui des désordres biologiques. Outre l'impact sur le bien-être animal, ce stress a des répercussions sur les résultats scientifiques eux-mêmes (Coleman 2011).

Dès l'arrivée du singe au laboratoire, l'entraînement par renforcement positif (ERP) type "clicker training" doit être activement pratiqué par tous les personnels en lien direct et régulier avec les animaux (ex : animaliers, vétérinaires, chercheurs) pour obtenir la coopération du singe à des procédures simples et brèves, communes à la majorité des protocoles scientifiques : se déplacer d'une cage à l'autre, venir dans une chaise de transport, être pesé, accepter une pique, etc. Chaque comportement désiré est récompensé par une petite quantité de nourriture choisie en fonction des goûts de l'animal (fruit, noix, etc.). Cet ERP est une constante tout au long du projet de recherche, il est utilisé pour le nettoyage et les soins vétérinaires, mais aussi pendant les sessions de travail (friandises de sortie de volière, « jackpots » de fin de session aux objectifs remplis). Ce n'est pas une alternative au contrôle hydrique.

Des méthodes d'ERP ont été développées par des primatologues reconnus dans leur domaine (Laule *et al.* 2003 ; Prescott *et al.* 2003, 2010, 2016 ; Prescott and Buchanan-Smith 2007 ; Schapiro *et al.* 2003). Ainsi, dans le cadre d'un protocole incluant un contrôle hydrique, l'apprentissage doit se faire en respectant les conditions suivantes :

1. Un entraînement par renforcement positif (ex : ERP type « *clicker training* ») doit être utilisé tout au long du projet pour obtenir la coopération des animaux aux activités brèves et simples. La réussite de l'apprentissage passe nécessairement par une relation positive entre la personne qui interagit avec l'animal et celui-ci. La formation des équipes aux méthodes d'ERP est un élément clé dans la réussite de la mise en place de ces apprentissages. Le programme d'entraînement doit être documenté et ajusté en fonction de la durée et du type de projet. Ce programme d'entraînement doit inclure les objectifs, la planification des séances, la méthode d'apprentissage, les actions réalisées, les tâches apprises par l'animal, les membres du personnel impliqués, et la durée des différentes étapes d'apprentissage.

2. Les chercheurs doivent expliquer en quoi leurs objectifs scientifiques (par exemple la fonction cognitive et les variables étudiées) nécessitent des sessions de travail quotidiennes longues et complexes ne pouvant être obtenues que par un ERP avec contrôle hydrique (qui vient s'ajouter à l'ERP type « *clicker training* » qui est maintenu pour récompenser tous les comportements désirés autres que les réponses spécifiques demandées pendant la session de travail). Il s'agit de réduire au minimum cette restriction en précisant clairement dans le projet combien de répétitions par jour l'animal doit faire, pour connaître le niveau de privation qui sera appliqué, avec une quantité minimale d'eau (ou d'aliment) assurée par jour. Dans ce cas, les animaux doivent faire objet d'un suivi clairement précisé et documenté dans le projet pour différents paramètres physiologiques (pesée tous les jours, évaluation de la fonction rénale, déshydratation intra et extra cellulaire tous les mois) et comportementaux (types de comportements, activités journalières, détection de comportements de stress ou comportements anormaux).

4. Mise en place progressive du contrôle hydrique

Le protocole de contrôle hydrique doit être mis en place progressivement sur plusieurs jours, voire plusieurs semaines. Cela donne au singe le temps de reconnaître et d'anticiper la disponibilité limitée de liquides et d'adapter ses habitudes de consommation (Prescott *et al.* 2010). Par exemple, la ration de liquide pourra être réduite graduellement par paliers de 10-15 % (Gray *et al.* 2016) jusqu'à ce que la motivation de l'animal permette d'atteindre l'objectif scientifique. A la fin de ce processus, la ration de travail individualisée par singe et par objectif sera identifiée.

Pendant cette mise en place progressive, chaque fois que le volume total de liquide reçu par l'animal est réduit, la performance de l'animal dans la tâche expérimentale, ainsi que son état physique, doivent être évalués pendant au moins 3 jours avant de procéder à toute réduction supplémentaire. Il est recommandé de consulter le vétérinaire et la personne référente du bien-être pour évaluer l'impact de cette réduction sur le bien-être de l'animal tout au long de la mise en place et lors de la détermination finale de la ration de travail.

5. Contrôle hebdomadaire et période de repos

Pendant le week-end, les animaux peuvent soit recevoir une ration d'eau identique à celle de la semaine (contrôle hebdomadaire sur 7 jours), soit avoir libre accès à l'eau (contrôle hebdomadaire sur 5 jours). Une étude comparative réalisée par Gray et collègues (2016) indique une absence d'effets physiologiques et comportementaux généraux, que les animaux restent sous contrôle hydrique le week-end ou non. Cependant dans un protocole sur 5 jours, les animaux peuvent ne pas atteindre l'objectif scientifique en début de semaine ; un protocole sur 7 jours pourrait permettre d'acquérir les données scientifiques nécessaires plus rapidement et ainsi de réduire le temps passé par les animaux sous contrôle hydrique (Gray *et al.* 2016).

A la fin du protocole, l'animal est remis graduellement en conditions de libre accès à l'eau. Sur des protocoles longs de contrôle hydrique, il est recommandé d'inclure des périodes de repos avec un accès libre à l'eau.

6. Ration minimale garantie

Les animaux reçoivent de la nourriture et de l'eau tous les jours sans exception, et ils ne passent jamais plus que 24 heures sans apport hydrique (Wood *et al.* 1982). L'animal doit avoir accès à l'eau lors de la consommation d'aliments, en particulier lorsqu'il s'agit d'aliments secs (ex : croquettes primates). Un accès à l'eau au moins deux fois par jour est préférable, et nécessaire lors des périodes de repos.

Chez le macaque, la ration de travail ne devrait pas être inférieure à 18-20 ml/kg/j, un niveau bas pour lequel il est démontré que les macaques sont capables de moduler efficacement leur osmolarité sanguine (Yamada *et al.* 2010). Cela signifie que pour une journée donnée, si la ration gagnée pendant la session de travail est inférieure à 18-20 ml/kg/j, le singe doit recevoir un complément de liquide après la fin de la session.

L'utilisation d'une ration de travail inférieure à 18-20 ml/kg/j chez le macaque nécessite une dérogation explicite du vétérinaire et cette dérogation doit être prévue dans la demande d'autorisation de projet.

7. Ajustement individuel par singe : ration de référence et ration de travail

La fréquence, les volumes et la nature des liquides donnés doivent être adaptés aux besoins de chaque animal. Cela permet d'optimiser la participation de chaque individu aux tâches qui sont récompensées par des liquides. Pour chaque animal, le volume de fluide consommé dans des conditions de libre accès doit être déterminé au préalable sur plusieurs jours, par exemple 5 jours non nécessairement consécutifs (Gray *et al.* 2016). Les fruits et les légumes donnés pendant ou après l'entraînement sont considérés comme faisant partie de la ration d'hydratation et doivent être notés. Cette phase permet le calcul de la ration de référence pour chaque animal. La ration hydrique de référence est donc une mesure individualisée correspondant à la consommation en libre accès.

À cette ration de référence se rajoute deux autres mesures individualisées décrites ci-dessous. La ration de travail est mesurée en lien avec les besoins scientifiques, et fait l'objet d'une révision constante en fonction de ces besoins. La ration minimale est individualisée sur la base d'un minimum physiologique (cf. point 6). Bien que ce dernier soit le minimum qu'un singe puisse recevoir, il ne doit pas s'agir systématiquement de la ration quotidienne d'un animal.

Toute méthodologie doit être ajustée pour maintenir une collecte de données adéquates tout en prenant en compte les variations interindividuelles (choix des préférences individuelles, programme de récompenses strict ou variable, etc.) afin de maintenir le contrôle hydrique au niveau le plus bas possible (Gray *et al.* 2018).

La détermination de la ration de référence peut impliquer une séparation temporaire (par exemple plusieurs fois par jour) de l'animal de son groupe. Dans ce cas, les animaux devraient être préalablement habitués à cette séparation pour garantir une mesure valable de la ration de référence, sachant que la séparation des animaux doit être réduite autant que possible.

8. Suivi de la ration de travail

La ration de travail sert de guide pour la consommation de liquide attendue pendant le travail, mais le critère de décision doit toujours être la réalisation de l'objectif scientifique. Par conséquent, si l'animal effectue la tâche de manière fiable pour atteindre l'objectif scientifique, il convient d'augmenter progressivement la ration de travail, tout en surveillant la performance dans la tâche expérimentale. En d'autres termes, il est nécessaire de chercher à ajuster la motivation des animaux (par exemple en manipulant la difficulté ou les récompenses hydriques) de telle sorte que la restriction hydrique soit la plus faible possible, tout en atteignant l'objectif scientifique.

Il est envisageable que sur une journée donnée, la ration totale d'hydratation soit inférieure à la ration de travail. Ces jours doivent être rares (par exemple lors des phases initiales de l'entraînement, cf. point 2). Ce cas peut être envisagé si la participation du singe doit être augmentée et si d'autres explications de la faible motivation (cf. point 12) ont été exclues. Dans tous les cas, la ration journalière ne devrait jamais être inférieure à la limite minimale fixée ci-dessus au point 6.

9. Suivi de l'état de santé et du bien-être des animaux pendant les périodes de contrôle hydrique

En dehors de l'impact physiologique, les impacts psychologiques et l'expérience subjective des animaux soumis au contrôle hydrique restent non évalués (Gray *et al.* 2016). Les changements de comportement observés chez des primates en contrôle hydrique peuvent être indicatifs d'une diminution du bien-être, et des recherches supplémentaires sont nécessaires sur les conséquences comportementales et psychologiques de ces protocoles (Prescott & Lidster 2017). Ainsi, quel que soit le type de contrôle hydrique mis en place, un suivi de l'état de santé et du bien-être des animaux doit être réalisé, pendant et après la mise en place.

Une fiche de suivi doit être tenue pour chaque singe placé sous contrôle hydrique. Cette fiche doit indiquer au minimum la ration de référence et la ration de travail, ainsi que, quotidiennement, la quantité de liquide obtenue lors la tâche, les suppléments et les fruits et / ou légumes donnés afin de noter le volume total calculé de liquides. Les indices de l'état d'hydratation, tels que l'élasticité de la peau (« le pli de peau »), l'hydratation des matières fécales, la quantité d'urine, l'hydratation des muqueuses et l'enfoncement des globes oculaires ainsi que des indices de santé générale, tels que l'état de la fourrure, la consommation de nourriture et le niveau d'activité générale doivent être documentés. La fiche de suivi doit être tenue quotidiennement et être accessible aux services vétérinaires réalisant les inspections réglementaires, au vétérinaire et à la structure chargée du bien-être animal (SCBEA).

Les animaux doivent être pesés régulièrement lors de la phase de contrôle hydrique. Des pesées régulières (chaque semaine) avant la période de contrôle permettent d'établir leur poids de référence. Toute anomalie clinique ou comportementale (présence d'un des signes listés ci-dessus, ou perte de poids > 10 % par rapport à la valeur moyenne mesurée sur les 3 derniers mois) doit être signalée au vétérinaire et entraîner un assouplissement du contrôle hydrique voire le retrait de l'animal de la procédure.

Il est nécessaire d'inclure des observations comportementales comme les manifestations de soif (un animal qui boit son urine ou lèche de manière compulsive chaque goutte d'eau présente dans son environnement), mais également une évaluation régulière de l'activité journalière afin de détecter les modifications de comportements comme l'apparition ou la hausse de la fréquence de comportements indicateurs de mal-être ou de stress, tels que l'apathie, l'agressivité, des comportements autodirigés ou des stéréotypies. Un changement de comportement sera décelable par un membre expérimenté du personnel de soins aux animaux ayant une connaissance détaillée des comportements «normaux» pour cet animal (Prescott *et al.* 2010) – il est donc impératif de veiller à la formation adéquate des équipes. Le planning de ce suivi comportemental ainsi que les paramètres à évaluer doivent être détaillés dans le protocole.

Le contrôle hydrique ou alimentaire peut également avoir un impact sur le bien-être des animaux du fait de changements dans la gestion des animaux : restrictions involontaires pour les congénères, augmentation du temps d'isolement de l'animal, limitation des comportements propres à l'espèce, etc. Les interactions sociales sont l'un des facteurs les plus importants influençant le bien-être des primates. Le logement social favorise un large éventail de comportements typiques des espèces et diminue le risque de développement de comportements anormaux et / ou réduit leur durée et leur fréquence (NC3Rs 2017).

Dans le cas où les animaux hébergés dans un même groupe ne participent pas tous simultanément à une étude nécessitant la mise en place d'un contrôle hydrique, ceux non intégrés à l'étude peuvent avoir un accès restreint à l'eau (par exemple, le groupe est en accès

libre à l'eau uniquement lorsque l'animal étudié est en session de travail). Les autres primates doivent donc être surveillés aussi étroitement que les animaux impliqués dans l'étude. Par ailleurs, une augmentation de la fréquence des comportements anormaux a été observée lorsque des groupes d'animaux sous contrôle hydrique ou alimentaire sont en mesure d'observer l'alimentation et l'abreuvement de groupes d'animaux non restreints maintenus dans la même colonie (Prescott *et al.* 2010).

Les animaux doivent avoir accès à l'eau lorsque leur ration alimentaire principale est distribuée (sauf dérogation spécifique lors de la demande d'autorisation de projet – voir paragraphe 2).

Néanmoins, la possibilité de fourrager constitue une part importante de leur activité journalière et elle est donc un élément essentiel pour le bien-être des primates. La mise en place d'un contrôle hydrique (ou alimentaire) ne doit pas supprimer cette possibilité d'activité pour l'animal. L'enrichissement alimentaire proposé doit tenir compte des contraintes liées au protocole (par exemple en diminuant l'apport calorique et en augmentant la complexité de la recherche alimentaire) pour éviter que cela affecte le programme scientifique en diminuant la motivation des primates à travailler. Dans ce cas, avec un programme d'enrichissement adapté, l'accès à l'eau systématique n'est pas nécessaire lors de la distribution de l'enrichissement au cours de la journée.

Il est donc nécessaire d'évaluer ces impacts indirects et les mesures compensatoires qui peuvent être mises en place. Ces restrictions indirectes et/ou supplémentaires, ainsi que les mesures pour y remédier doivent apparaître dans la demande d'autorisation de projet et décrites en détail, tout comme lors de la présentation du protocole à la SCBEA de l'établissement.

10. Suivi vétérinaire spécifique au contrôle hydrique

Les données publiées et l'expérience suggèrent que les suivis décrits ci-dessus assureront un animal en bonne santé tout au long du contrôle hydrique. Pour vérifier néanmoins que l'état physiologique de chaque singe n'est pas une contraindication à la mise en œuvre du contrôle hydrique, il est souhaitable de réaliser des analyses hémato-biochimiques du sang et des urines afin de confirmer l'état de la fonction rénale et de l'hydratation. Il est aussi souhaitable que ces analyses soient poursuivies pendant la période de contrôle hydrique, par exemple tous les 6 mois.

11. Définition des points limites

Un point limite est le moment où la douleur, la détresse et/ou l'inconfort doivent être arrêtés, minimisés ou réduits en :

- arrêtant l'intervention douloureuse ;
- administrant un traitement visant à soulager la douleur ou la détresse ;
- restaurant les exigences de base (ex. : remettre un animal isolé en hébergement de groupe) ;
- euthanasiant l'animal selon la réglementation en vigueur.

Toute souffrance, détresse ou inconfort réels ou potentiels des animaux devraient être minimisés ou soulagés en choisissant le point limite le plus précoce compatible avec les objectifs scientifiques de la recherche.

Les points limites spécifiques sont définis avant la mise en œuvre du protocole et doivent être adaptés à la situation de contrôle hydrique. L'utilisation de systèmes d'évaluation quantitative (grilles d'évaluation) est recommandée. Les critères à évaluer correspondent à des signes comportementaux, physiologiques ou cliniques, tels que : poids corporel, apparence physique, changements de comportement (lors la tâche et hors session de travail), résultats expérimentaux (durée, répétabilité, performances des animaux). Un animal sous contrôle hydrique qui refuse les aliments secs est un signal d'alerte d'une possible déshydratation et, à ce titre, doit faire partie des points limites. Les manifestations comportementales et anomalies cliniques décrites au paragraphe 8 sont à inclure dans les critères à évaluer.

12. Gestion des mauvaises performances lors du contrôle hydrique

En cas de mauvaises performances d'un animal, il est important d'envisager toutes les explications et solutions possibles avant de réduire la ration de fluides. L'identification de la boisson ou des boissons préférées de l'animal peut aider à optimiser motivation et performance pour chaque individu, et différents programmes de récompense peuvent être testés pour trouver celui qui convient le mieux à l'animal (Gray *et al.* 2018). Des tâches alternatives attractives ou plus simples doivent aussi être envisagées pour relancer la motivation. Une plus grande nouveauté des tâches ou des stimulus, si cela est compatible avec l'étude, peut augmenter la participation des animaux (Andrews & Rosenblum 2001). Des marqueurs comportementaux (type de mouvements oculaires, agitations, endormissement, agressivité, etc.) peuvent donner des indications précieuses sur la cause de la baisse de motivation et donc de l'arrêt prématuré du travail.

13. Arrêt progressif du contrôle hydrique

Lorsqu'un animal quitte la phase de contrôle hydrique, il est nécessaire d'augmenter progressivement la quantité d'eau librement disponible sur une période de plusieurs jours ou plusieurs semaines et de surveiller attentivement l'animal. Cela réduit le risque de consommation excessive d'eau, entraînant une hyponatrémie ou une dilatation aigue d'estomac (Wood *et al.* 1982 ; Toth & Gardiner 2000).

14. Contrôle hydrique en cas d'anesthésie générale

Lorsque l'animal doit être impliqué dans une procédure chirurgicale, il doit avoir un accès à l'eau à volonté au moins 48 h avant la procédure. Cet arrêt du contrôle hydrique doit se faire progressivement comme indiqué dans le paragraphe précédent.

Après la chirurgie, il est important de donner un accès libre à l'eau aux animaux jusqu'à ce que le vétérinaire indique que le contrôle hydrique peut reprendre, ou jusqu'à ce que le traitement post-opératoire soit complètement terminé.

Dans le cas d'une anesthésie générale réalisée dans le cadre d'une procédure non-chirurgicale (par exemple un scan IRM sous anesthésie), il est préférable que l'animal ait accès à l'eau au moins 24 h avant la procédure. Une période d'au moins 24 h de récupération avec libre accès à l'eau sera offerte à l'animal avant que, en accord avec le vétérinaire, le contrôle hydrique puisse reprendre.

Références

- Andrews MW, Rosenblum LA. 2001. Effects of change in social content of video rewards on response patterns of bonnet macaques. *Learning and Motivation* 32:401–408. <https://doi.org/10.1006/lmot.2001.1092>
- Buchanan-Smith HM, Gamble MR, Gore M *et al.* 2009. Refinements in husbandry, care and common procedures for non-human primates. *Laboratory Animals* 43:1–47. <https://doi.org/10.1258/la.2008.007143>
- Coleman K. 2011. Caring for non-human primates in biomedical research facilities: scientific, moral and emotional considerations. *American Journal of Primatology* 73:220–225. <https://doi.org/10.1002/ajp.20855>
- Gray H, Bertrand H, Mindus C *et al.* 2016. Physiological, behavioral, and scientific impact of different fluid control protocols in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*). *eNeuro* 3:1–15. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0195-16.2016>
- Gray H, Thiele A, Rowe C. 2018. Using preferred fluids and different reward schedules to motivate rhesus macaques (*Macaca mulatta*) in cognitive tasks. *Laboratory animals*, 53(4), 372-382.
- Laule GE, Bloomsmith MA, Schapiro SJ (2003) The Use of Positive Reinforcement Training Techniques to Enhance the Care, Management, and Welfare of Primates in the Laboratory. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 6:163. https://doi.org/10.1207/S15327604JAWS0603_02
- McMillan JL, Bloomsmith MA, Prescott MJ. 2017. An international survey of approaches to chair restraint of nonhuman primates. *Comparative Medicine* 67:442–451.
- NC3Rs. 2017. Non-human primate accommodation, care and use. London <https://www.nc3rs.org.uk/non-human-primate-accommodation-care-and-use>
- Prescott M, Buchanan-Smith H. 2007. Training laboratory-housed non-human primates, part I: a UK survey. *Animal Welfare* 16:21.
- Prescott MJ. 2016. Online resources for improving the care and use of non-human primates in research. *Primate Biology* 3:33.
- Prescott MJ, Brown VJ, Flecknell PA *et al.* 2010. Refinement of the use of food and fluid control as motivational tools for macaques used in behavioural neuroscience research: Report of a Working Group of the NC3Rs. *Journal of Neuroscience Methods* 193:167–188. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.09.003>
- Prescott MJ, Lidster K. 2017. Improving quality of science through better animal welfare: The NC3Rs strategy. *Laboratory Animals* 46:152–156. <https://doi.org/10.1038/labani.1217>
- Prescott MJ, Sussex W, Buchanan-Smith HM. 2003. Training nonhuman primates using positive reinforcement techniques. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 6:157-161.
- Schapiro SJ, Bloomsmith MA, Laule GE. 2003. Positive Reinforcement Training As a Technique to Alter Nonhuman Primate Behavior: Quantitative Assessments of Effectiveness. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 6:175. https://doi.org/10.1207/S15327604JAWS0603_03
- Toth LA, Gardiner TW. 2000. Food and Water Restriction Protocols: Physiological and Behavioral Considerations. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* 39:9–17.
- Wood RJ, Rolls ET, Rolls BJ. 1982. Physiological mechanisms for thirst in the nonhuman primate. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 242(5):R423-8. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1982.242.5.r423>
- Yamada H, Louie K, Glimcher PW. 2010. Controlled water intake: A method for objectively evaluating thirst and hydration state in monkeys by the measurement of blood osmolality. *Journal of Neuroscience Methods* 191:83–89. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.06.011>

Liens

Association of Primate Veterinarians Scientific Advisory Committee Guidelines (US)
<https://www.primatevets.org/guidance-documents>

The National Centre for the 3Rs (UK) <https://www.nc3rs.org.uk/refining-food-and-fluid-control-behavioural-neuroscience-macaques>