

Université de Montréal

**Évaluations physiologiques de la tricaine  
méthanesulfonate pour l'anesthésie des grenouilles  
africaines à griffes (*Xenopus laevis*)**

par

Vanessa Lalonde-Robert

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès Sciences (M. Sc.)

en sciences vétérinaires

option médecine des animaux de laboratoire

Avril, 2013

© Vanessa Lalonde-Robert, 2013

## Résumé

Il existe peu d'études sur les effets physiologiques et pharmacologiques du médicament anesthésiant le plus utilisé chez les anoures, la tricaïne méthanesulfonate, et son utilisation chez la grenouille *Xenopus laevis*. Notre premier objectif était d'évaluer l'effet de bains d'immersion de 20 minutes de 1 et 2 g/L de tricaïne méthanesulfonate sur la fonction cardiorespiratoire, l'analgésie et les réflexes ainsi que d'étudier la pharmacocinétique. Nos résultats démontrent que des bains de 1 et 2 g/L produisent une anesthésie chirurgicale de 30 et 60 minutes respectivement, sans effet significatif sur le système cardiorespiratoire. À la suite d'une immersion à 2 g/L, on note une demi-vie terminale de 3,9 heures. Cette dose ne produit aucun effet sur l'histologie des tissus 24 heures après l'immersion. Dans une deuxième expérience, nous avons évalué les effets d'une surdose de tricaïne méthanesulfonate en bain d'immersion sur les systèmes cardiorespiratoire et nerveux central grâce à l'électroencéphalographie ainsi que l'effet d'une injection de pentobarbital sodique après 2 heures d'immersion. L'EEG montre un effet dépresseur sur le SNC avec l'utilisation de la tricaïne méthanesulfonate sans voir un arrêt de signal d'EEG sur la période de 2 heures d'enregistrement. Les surdoses à 1 g/L et 3 g/L n'ont pas d'effet significatif sur le rythme cardiaque, et l'injection de pentobarbital suite au bain d'immersion de tricaïne méthanesulfonate est nécessaire pour induire l'euthanasie. Nous avons démontré que le bain de tricaïne méthanesulfonate peut produire une anesthésie de 30 à 60 minutes avec dépression du SNC sans effet cardiovasculaire chez les *Xenopus laevis*.

**Mots-clés :** Tricaïne méthanesulfonate, anesthésie, euthanasie, amphibien, grenouille africaine à griffes, pharmacocinétique, électroencéphalographie.

## Abstract

Very few studies exist on the physiological and pharmacological effects of the most commonly used anesthetic agent used in amphibians, tricaine methanesulfonate, in *Xenopus laevis* frogs. Our first goal was to measure the effects of 20 minutes bath immersions of 1 and 2 g/L tricaine methanesulfonate on cardiorespiratory system, analgesia and reflexes. We also studied the pharmacokinetic of tricaine methanesulfonate following an immersion in a 2 g/L bath. Our results show that both 1 and 2 g/L baths produce surgical anesthesia during 30 and 60 minutes respectively, without significant effect on the cardiorespiratory system. Following the immersion in a 2 g/L bath, the tricaine methanesulfonate has a terminal half-life of 3,9 hours and no effect on tissue histology is observed 24 hours after anesthesia. In a second experiment, we evaluated the effects of tricaine methanesulfonate overdose on cardiorespiratory system and on central nervous system using electroencephalography. Moreover, we evaluated the effect of sodium pentobarbital injection after 2 hours of immersion. A significant EEG depression of central nervous system activity occurred with the use of tricaine methanesulfonate following 2 hours of recording and the pentobarbital injection was necessary to induce euthanasia. We showed that tricaine methanesulfonate can produce safe anesthesia of 30 to 60 minutes with reduction of CNS activity and without cardiorespiratory effect in *Xenopus laevis*.

**Keywords** : Tricaine methanesulfonate, anesthesia, euthanasia, amphibian, African clawed frog, pharmacokinetics, electroencephalogram.

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des sigles et des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi
Introduction.....	1
Chapitre 1: Recension de la littérature.....	3
1. <i>Introduction</i> .....	3
1.1 Utilisation des grenouilles <i>Xenopus laevis</i> et <i>X.tropicalis</i> en recherche.....	3
1.2 Particularités physiologiques des amphibiens et voies d'administration.....	5
1.3 Perception et transmission de la douleur chez les grenouilles.....	7
2. <i>Anesthésie des amphibiens</i> .....	9
2.1 Définition de l'anesthésie.....	9
2.2 Procédures préanesthésiques.....	10
2.3 Médicaments anesthésiants.....	11
2.3.1 La tricaïne méthanesulfonate.....	11
2.3.2 L'eugénol.....	15
2.3.3 La benzocaïne.....	18
2.3.4 Autres médicaments anesthésiants des anoures.....	20
2.4 Évaluation et surveillance de l'anesthésie.....	23
2.4.1 Évaluation des réflexes.....	23
2.4.2 Évaluations cardiovasculaire et respiratoire.....	24
2.4.3 Électroencéphalographie chez les amphibiens.....	26
2.5 Procédures postanesthésiques.....	31
3. <i>Euthanasie des amphibiens</i> .....	32
3.1 Définition d'euthanasie.....	32
3.2 Méthodes chimiques.....	33

3.2.1	Surdose de tricaïne méthanesulfonate.....	33
3.2.2	Surdose de benzocaïne.....	34
3.2.3	Barbituriques.....	35
3.3	Méthodes physiques.....	36
3.3.1	Décérébration et décapitation.....	36
3.3.2	Congélation.....	37
4.	<i>Introduction à la pharmacocinétique des anesthésiques</i> .....	37
Chapitre 2:	Objectifs et hypothèses.....	43
Chapitre 3 :	Articles.....	45
1.	<i>Premier article</i> .....	45
1.1	Abstract.....	46
1.2	Introduction.....	46
1.3	Materials and methods.....	47
1.4	Results.....	52
1.5	Discussion.....	54
1.6	Acknowledgements.....	57
1.7	References.....	57
1.8	Legend to figures.....	61
2.	<i>Deuxième article</i> .....	65
2.1	Abstract.....	66
2.2	Introduction.....	66
2.3	Materials and Methods.....	68
2.4	Results.....	72
2.5	Discussion.....	73
2.6	Acknowledgment.....	77
2.7	References.....	77
2.8	Legend to figures.....	81
Chapitre 4 :	Discussion générale.....	89
Conclusion	.....	99
Bibliographie	.....	100

## Liste des tableaux

### *Chapitre 1*

Tableau I. Résumé des paramètres pharmacocinétiques du propofol et de l'eugénol administrés en bain d'immersion chez la grenouille africaine à griffes, <i>Xenopus laevis</i> .....	41
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## Liste des figures

### *Premier article*

Figure 1. Heart rate (bpm; mean  $\pm$  1 SD) of *Xenopus laevis* frogs ( $n = 6/\text{dose}$ ) after their immersion for 20 min in a solution of MS222 at either 1 or 2 g/L. The -30 min and 0 min time points respectively represent control values prior to and immediately after immersion.....61

Figure 2. Respiratory frequency (breaths per minute; mean  $\pm$  1 SD) of *Xenopus laevis* frogs ( $n = 6$  per dose) after their immersion for 20 min in a solution of MS222 at either 1 or 2 g/L. The -30 min and 0 min time points respectively represent control values prior to and immediately after immersion.....62

Figure 3. Oxygen saturation (%; mean  $\pm$  1 SD) of *Xenopus laevis* frogs ( $n = 6/\text{dose}$ ) after their immersion for 20 min in a solution of MS222 at either 1 or 2 g/L. The -30 min and 0 min time points respectively represent control values prior to and immediately after immersion.....63

Figure 4. Plasma concentration (mean  $\pm$  1 SD) after the immersion of *Xenopus laevis* frogs ( $n = 6/\text{dose}$ ) for 20 min in a solution of MS222 at either 1 or 2 g/L. The -30 min and 0 min time points respectively represent control values prior to and immediately after immersion.....64

### *Deuxième article*

Figure 1. Electrode placement on a *X. laevis* frog for electroencephalographic recording, using a conducting screw (right) and a crocodile clip (left). The frog is partially immersed in the MS222 solution (1 or 3 g/L concentration).....81

Figure 2. Photomicrograph of a histologic section of the head showing the trepanation hole (distance between the small arrow heads) and the undamaged brain (large arrow). Hematoxylin–eosin–safron stain.....	82
Figure 3. Photomicrograph of a histologic section anterior to a trepanation showing the undamaged brain (arrow) and surrounding bone of the skull. Hematoxylin–eosin–safron stain.....	83
Figure 4. Heart rate (mean $\pm$ SEM) of <i>X. laevis</i> frogs after immersion in MS222 at 3 g/L ( $n = 6$ ) or 1g/L ( $n = 3$ ) for the duration of the study (2 h).....	84
Figure 5. Oxygen saturation (mean $\pm$ SEM) of <i>X. laevis</i> frogs after immersion in MS222 at 3 g/L ( $n = 6$ ) or 1g/L ( $n = 3$ ) for the duration of the study (2 h).....	85
Figure 6. Electroencephalographic (EEG) amplitude (mean $\pm$ SEM) after immersion of <i>X. laevis</i> frogs in MS222 ( $n = 9$ ; 6 frogs at 3g/L and 3 frogs at 1g/L) for the duration of the study (2 h).....	86
Figure 7. Electroencephalographic (EEG) frequency (mean $\pm$ SEM) after immersion of <i>X. laevis</i> frogs in MS222 ( $n = 9$ ; 6 frogs at 3g/L and 3 frogs at 1g/L) for the duration of the study (2 h).....	87



Figure 8. Representative electroencephalographic recording of a *X. leavis* frog at (A) 15 min after induction and (B) at the end of the recording session (prior to pentobarbital administration) after immersion in 3 g/L MS222. Note the high-amplitude low-frequency tracing at the early time point and the low-amplitude electroencephalographic recording at the late time point. Bars: x axis = 1 s; y axis = 10  $\mu$ V.....88

## Liste des sigles et des abréviations

AAT: Test à l'acide acétique/Acetic acid test

AUC: Aire sous la courbe/Area under the curve

AUC<sub>inf</sub>: Aire sous la courbe extrapolée à l'infini/Area under the curve extrapolated to infinity

AUC<sub>0-t</sub>: Aire sous la courbe du temps 0 jusqu'à la dernière concentration plasmatique mesurée/  
Area under the curve from time 0 to the last measurable plasmatic concentration

AVMA: American Veterinary Medical Association

CGRP: peptide relié au gène de la calcitonine

Cl: Clairance

C<sub>max</sub>: Concentration plasmatique maximale

C<sub>pt</sub>: Dernière concentration plasmatique mesurée

E: Coefficient d'extraction

EEG: Électroencéphalogramme/Électroencéphalographie

F: Biodisponibilité

GABA: acide gama-aminobutyrique

HCl: Chlorure d'hydrogène

k<sub>e</sub>: Constante d'élimination

MS-222: Marque de commerce de la tricaïne méthanesulfonate (Finquel, Argent Chemical Laboratories, Redmond, WA) couramment utilisée pour désigner le médicament

*per os*: Par la bouche/par gavage

Q: Débit sanguin

QRS: Complexe comprenant les ondes Q, R et S sur l'électrocardiogramme

QT: Intervalle entre les ondes Q et T sur l'électrocardiogramme

SNC: Système nerveux central

sp: Espèce

T<sub>1/2</sub>: Temps de demi-vie d'élimination

T<sub>max</sub>: Temps de concentration maximale

V<sub>d</sub>: Volume de distribution/Distribution volume

*À maman,*

*À Jean-Michel.*

## Remerciements

Mes sincères remerciements au Dr Pascal Vachon pour sa patience, son humour et sa passion pour le domaine de la recherche. Il a rendu disponible les ressources nécessaires à la réalisation de ce projet ainsi qu'à mes formations. Merci Pascal pour la générosité.

Merci au Dr Francis Beaudry pour sa franchise, son aide et sans qui je serais encore à la bibliothèque à essayer de comprendre les mystères de la spectrométrie de masse en tandem.

Merci au Dr Sébastien Desgent et à Sandra Duss de m'avoir fait découvrir le monde de l'électroencéphalographie et de m'avoir accompagnée dans ce projet. Merci au Dr Lionel Carmant pour le prêt de matériel et Dr Gregor Adolfinger pour le don de grenouilles.

Merci au Dre Marie-Lou Gauthier pour la motivation, le temps passé à étudier et à faire des présentations.

Merci à Madame Manon Lalonde pour son intérêt envers tout ce que je fais. Voir sa mère s'intéresser à l'anesthésie de la grenouille africaine à griffes, ça fait chaud au cœur.

J'aimerais également remercier Lily, mon chat. Source de réconfort et de chaleur.

## Introduction

L'utilisation des animaux en laboratoire repose sur un principe éthique appelé les « trois R » : raffinement, réduction et remplacement. Le conseil canadien de protection des animaux en sciences (2013) définit le raffinement comme « les modifications apportées aux méthodes d'élevage ou aux procédures expérimentales afin de réduire la douleur et la détresse ». Puisque les amphibiens ont les structures nécessaires à la perception de la douleur et démontrent des comportements relatifs à celle-ci, il est du devoir du vétérinaire et des utilisateurs d'animaux d'assurer une anesthésie ainsi qu'une analgésie adéquate lors des manipulations sur les anoures afin de réduire la détresse et la douleur. La grenouille *Xenopus laevis* représente une des espèces les plus utilisées en laboratoire, mais peu d'études existent sur les effets du médicament anesthésiant et euthanasiant le plus utilisé chez les amphibiens : la tricaine méthanesulfonate. La tricaine méthanesulfonate est un méta-amino isomère de la benzocaïne (Downes, 1995) utilisé comme médicament anesthésiant qui peut s'administrer à l'aide d'un bain d'immersion chez les anoures.

Tout d'abord, je ferai la recension de la littérature au sujet des particularités des anoures et des grenouilles *Xenopus laevis*, de l'anesthésie et de l'euthanasie des amphibiens. J'y démontrerai les besoins pour des données plus précises sur l'anesthésie et l'euthanasie des grenouilles *Xenopus laevis*. Ensuite s'enchaîneront deux articles, où nous démontrons dans le premier article les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du bain d'immersion de MS-222 à des concentrations de 1 et de 2 g/L. Le deuxième article démontra les effets de la surdose de tricaine méthanesulfonate administrée en bain d'immersion sur les systèmes cardiovasculaire et respiratoire ainsi que sur le système nerveux central grâce à

l'utilisation de l'électroencéphalographie. Finalement, je discuterai des méthodes et résultats obtenus lors de ces deux expériences. Les effets physiologiques du MS-222 lors de l'anesthésie et le rôle inattendu de la peau lors de la respiration des grenouilles *Xenopus laevis* seront abordés dans la discussion.

# Chapitre 1: Recension de la littérature

## 1. Introduction

### 1.1 Utilisation des grenouilles *Xenopus laevis* et *X.tropicalis* en recherche

La contribution des modèles amphibiens en recherche et en enseignement est riche. Historiquement, on pense d'abord à l'utilisation des grenouilles pour enseigner la physiologie, à l'utilisation des tritons et des axolotls pour la recherche sur la régénération des membres et à l'utilisation des grenouilles *Xenopus laevis* pour l'élaboration des tests de grossesse chez la femme (O'Rourke & Shultz, 2002). Plus récemment, une équipe de recherche a utilisé la grenouille léopard (*Rana pipiens*) comme modèle de douleur pour la recherche sur les récepteurs opioïdes et sur les analgésiques (Stevens, 2004). L'utilisation des amphibiens ne se limite pas aux études sur les adultes puisque les œufs, les embryons et les têtards sont également utilisés en recherche.

Le développement des embryons à l'extérieur de la femelle apporte un avantage considérable pour les études portant sur le développement et la tératologie. La grosseur des œufs des grenouilles *Xenopus laevis* (1,0 à 1,2 mm) et le développement externe des embryons d'amphibiens permettent plus facilement les manipulations telles que les injections et la microchirurgie ainsi que l'observation directe de modifications morphologiques (Green, 2010). La récolte d'oocytes est une des activités principales en laboratoire. Dans l'environnement de laboratoire, une femelle *X. laevis* peut produire de 300 à 1000 œufs à la suite d'une induction hormonale (hormone gonadotrophine chorionique humaine) et ce, à n'importe quel moment de l'année pendant plusieurs années (typiquement 3 à 6 ans) (Green,

2010). Ces avantages de l'utilisation des grenouilles *Xenopus laevis* permettent des échantillons de grandes tailles et l'utilisation d'un nombre limité d'animaux.

La grenouille africaine à griffes, *Xenopus laevis*, est également utilisée à travers le monde pour des expériences *in vivo* et *in vitro* et ce, dans plusieurs sphères de recherche dont la biologie et la physiologie cellulaire et moléculaire, l'embryologie et la génomique (Green, 2010; Khoka et al., 2011). Le modèle est utilisé dans presque tous les domaines, notamment le développement cardiovasculaire, immunitaire et comportemental. Par exemple lors d'études sur la cardiogénèse, l'utilisation d'un embryon de grenouille *Xenopus laevis* permet d'exécuter une microchirurgie sur un modèle animal qui a une capacité de guérison rapide (Afouda & Hoppler, 2009). De plus, les cellules embryonnaires se développent facilement en culture et le modèle produit des explants qui se développeront en tissus cardiaques (Afouda & Hoppler, 2009).

L'utilisation des grenouilles *Xenopus laevis* n'est pas sans désavantage : elles possèdent un génome allotetraploïde qui limite leur utilisation pour le séquençage génétique et la formation de modèles transgéniques (Beck & Slack, 2001). Par contre, l'espèce *Xenopus tropicalis*, qui possède la plupart des qualités des grenouilles *X. laevis*, détient un génome diploïde permettant plus facilement le séquençage et la production d'individus transgéniques. De plus, la grenouille *X. tropicalis* a une taille réduite et atteint la maturité sexuelle plus rapidement (3-4 mois versus 12-24 mois pour *X. laevis*), ce qui procure des avantages d'économie de temps et d'espace (Green, 2010). Le génome de la grenouille *X. tropicalis* est complètement séquencé (Hellsten et al., 2010). Cela permet des études comparatives avec le génome des mammifères et l'obtention une base de données importante pour la recherche comparative et évolutive (Hellsten et al., 2010).



## 1.2 Particularités physiologiques des amphibiens et voies d'administration

Les amphibiens possèdent des caractéristiques anatomiques et physiologiques qui les distinguent des mammifères utilisés en recherche. Ces caractéristiques sont importantes à comprendre, car elles demandent la modification de certaines techniques.

Les grenouilles *Xenopus* sont des espèces aquatiques (Wright, 1996). Lors de manipulations, elles doivent donc être maintenues dans l'eau ou suffisamment humidifiées afin d'éviter la dessiccation. Les amphibiens sont des poïkilothermes; ils dépendent de la température environnementale pour réguler leur température corporelle (O'Rourke & Shultz, 2002; Green, 2010). Les grenouilles *X. laevis* et *X. tropicalis* requièrent des températures environnementales entre 16 et 22 °C et entre 25 et 30 °C respectivement (Green, 2010).

Certaines particularités des grenouilles entraînent des contraintes dans l'administration de médicaments. D'abord, les grenouilles *Xenopus* régurgitent leur estomac facilement et peuvent vider leur contenu stomacal en présence de contenu toxique (Green, 2010); il est donc peu conseillé de donner des médicaments *per os*. Les grenouilles ne possédant pas de diaphragme, les injections dans la cavité abdominale se font donc dans le coelome (injections intracœlomiques) (O'Rourke & Shultz, 2002), puisque les cavités thoracique et abdominale forment la cavité coelomique. Elles possèdent une peau très perméable aux molécules et aux ions. Cela permet une administration systémique de certains médicaments comme l'application cutanée de benzocaïne en gel (Torreilles et al., 2009), le timbre d'isoflurane (Smith & Stump, 2000) ou l'immersion dans une solution de tricaïne méthanesulfonate (Cecala et al., 2007) ou d'eugénol (Guénette et al., 2007). Les grenouilles *Xenopus* ont des

poumons très développés et respirent principalement de cette façon (Green, 2010). Un certain degré d'échanges gazeux se produit par la peau, mais il semble insuffisant à lui seul pour maintenir des fonctions physiologiques normales (Green, 2010). Les grenouilles possèdent des cœurs lymphatiques qui permettent des injections dans des sacs lymphatiques reliés à la circulation systémique. Ces cœurs lymphatiques sont situés en partie caudo-dorsale de la grenouille, de part et d'autre de la colonne vertébrale (Shumacher, 1996). Comme chez les mammifères, il est également possible d'administrer des médicaments par la voie intramusculaire dans les membres antérieurs et postérieurs. L'administration de médicaments par la voie intraveineuse est peu utilisée chez les amphibiens, car l'accessibilité aux vaisseaux est difficile, surtout chez les petites espèces et chez les espèces sans queue ni langue (Mitchell, 2009; Green, 2010). Les vaisseaux les plus utilisés sont le plexus sous-lingual, la veine caudale et la veine médiale abdominale (Wright, 1996). Chez les anoures, l'administration sous-cutanée est possible au niveau de la cuisse et des flancs et en partie dorsale du corps de l'animal (Clayton & Gore, 2007). Finalement, l'administration de médicaments peut se faire par la voie intraspinale. Stevens et collaborateurs (1996, 1997) ont utilisé la voie spinale pour l'administration de médicaments analgésiques tels les opioïdes et les agonistes adrénergiques chez les grenouilles *Rana pipiens*.

Au niveau du système cardiovasculaire, le cœur des grenouilles *Xenopus* a la capacité de se contracter très longtemps après la cessation de la respiration et la disparition des réflexes (Green, 2010).

Pour une anesthésie adéquate des grenouilles *Xenopus* sp, il est important de tenir compte de toutes ces caractéristiques physiologiques et anatomiques et donc d'y adapter nos techniques.

### 1.3 Perception et transmission de la douleur chez les grenouilles

Il est difficile de dire si les grenouilles ressentent la douleur de la même façon dont elle serait perçue chez les autres mammifères. Par contre, elles possèdent plusieurs structures nerveuses responsables de la transmission de la nociception (Stevens, 2004) et elles expriment des comportements relatifs à la douleur qui sont similaires à ceux des mammifères (Green, 2003; Machin, 1999).

Les récepteurs cutanés, les fibres nerveuses afférentes, les voies spinales et le cerveau sont des structures hautement organisées chez les mammifères et elles sont nécessaires à la nociception et à la perception de la douleur (Stevens, 2004). Les grenouilles possèdent des récepteurs cutanés, dont des terminaisons nerveuses libres, qui réagissent à des stimuli nociceptifs tels que l'acide, la chaleur et la pression mécanique (Spray, 1976). Bien que les grenouilles possèdent des terminaisons nerveuses dans le derme et l'épiderme ainsi que des axones myélinisés et non myélinisés, les terminaisons nerveuses libres associées à la nociception sont surtout trouvées dans la couche profonde du derme et sont surtout associées à des axones non myélinisés (Spray, 1976; Stevens, 2004). Parmi les fibres nerveuses afférentes, nous retrouvons des fibres A $\delta$  et C, qui sont des fibres de petit diamètre, ayant une basse vitesse de conduction; elles sont principalement responsables de la transmission de l'influx nociceptif (Hamamoto & Simone, 2003; Stevens, 2004). Les fibres afférentes nociceptives passent par la corne dorsale de la moelle épinière et se terminent majoritairement dans les lames dorsales superficielles de façon plutôt diffuse (Spray, 1976; Stevens, 2004). Dans la moelle épinière, les grenouilles possèdent des neurotransmetteurs similaires aux mammifères tels que le glutamate, le GABA, les endomorphines, la substance P et le peptide relié au gène

de la calcitonine (CGRP) (Stevens, 2004). Chez les amphibiens, il existe peu de recherche sur la transmission de l'influx nerveux nociceptif de la moelle épinière vers le cerveau (Spray, 1976). Alors que chez les mammifères il existe également des connexions directes entre la moelle épinière et le thalamus puis du thalamus vers le cortex, la plupart des connexions des voies nociceptives chez les grenouilles se forment entre la moelle et le tronc cérébral (Stevens, 2004). L'information se rend donc au thalamus de façon indirecte. Puis, en passant par des noyaux thalamiques de façon diffuse et peu organisée (Stevens, 2004), les fibres se terminent dans le télencéphale non olfactif de façon diffuse (Spray, 1976). Les grenouilles semblent donc posséder toutes les structures nécessaires à la nociception et à la perception de la douleur, mais certaines de ces structures ne possèdent pas le degré d'organisation présent chez les mammifères.

Des études sur l'utilisation d'opioïdes (Stevens, 2004), de médicaments alpha adrénergiques (Brenner et al., 1994) et de médicaments pharmacologiques divers, tels les benzodiazépines, la chlorpromazine, le pentobarbital et les anti-inflammatoires non stéroïdiens, (Stevens et al., 2001) ont toutes démontré un certain niveau d'analgésie chez les grenouilles *Rana pipiens*. Ces résultats analgésiques suggèrent donc des voies nociceptives similaires aux mammifères. Les amphibiens montrent également des comportements en réponse à des stimuli nociceptifs. Certains vocalisent alors que d'autres vont mordre la source de douleur (Green, 2003; Machin, 1999). Plus fréquemment, les grenouilles vont tout simplement éviter les stimuli douloureux (Green, 2003; Machin, 1999).

Les résultats d'études sur la douleur chez les grenouilles indiquent la présence de voies nociceptives et poussent les vétérinaires à traiter la douleur chez ces espèces comme ils traitent

la douleur chez les autres vertébrés utilisés en recherche. L'utilisation éthique des amphibiens en recherche devrait donc reposer sur des techniques d'analgésie et d'anesthésie adéquates.

## 2. *Anesthésie des amphibiens*

### 2.1 Définition de l'anesthésie

L'anesthésie générale se définit comme l'effet de médicaments pharmacologiques créant un état d'inconscience et ayant un effet dépresseur réversible sur le système nerveux central durant lequel l'animal n'est pas affecté par différents stimuli (Thurmon & Short, 2007). L'anesthésie chirurgicale est un moment de l'anesthésie générale où il y a :

- perte de conscience,
- relaxation musculaire/immobilité,
- analgésie (Thurmon & Short, 2007) et
- amnésie (Fish et al., 2008).

L'anesthésie des animaux de laboratoire permet de réduire le stress et la nociception/douleur reliés aux manipulations et elle permet de faciliter les procédures en immobilisant l'animal.

Chez les amphibiens, il n'y a pas de définition claire de l'anesthésie et de ses différents niveaux. La majorité des auteurs définissent l'état d'anesthésie lorsque l'animal perd le réflexe de retrait et le réflexe de redressement (Crawshaw, 1993; Guénette et al., 2007; Stetter et al., 1996). La profondeur de l'anesthésie est ensuite évaluée par la perte de respirations abdominales et la diminution, voire l'arrêt des mouvements gulaires (Crawshaw, 1993).

Bien que moins claire que chez les mammifères, la définition d'anesthésie des amphibiens proposée ci-dessus nous permet d'évaluer les effets physiologiques de certains médicaments anesthésiques et nous donne des guides sur la profondeur anesthésique.

## 2.2 Procédures préanesthésiques

Le jeûne est une étape moins essentielle chez les amphibiens, car la régurgitation et les vomissements sont beaucoup moins courants chez ces espèces, le larynx étant bien fermé durant l'anesthésie (Stetter, 2001; Wright, 2001). Il est cependant recommandé et préférable de mettre les amphibiens au jeûne. Les petits anoues de moins de 20 g bénéficieront d'un jeûne court de moins de 4 heures, tandis que les anoues de taille moyenne (plus de 20 g) profiteront d'une période de jeûne de 48 heures (Wright, 2001). Finalement, il est possible de retirer la nourriture chez les grands amphibiens au minimum 7 jours avant la procédure (Wright, 2001). La durée du jeûne doit cependant tenir compte de l'état de santé de l'animal et des conditions de garde (exemple : température plus froide) (Wright, 2001).

Un examen préanesthésique est important chez les amphibiens afin de confirmer l'état de santé de l'animal et de prévenir les complications possibles durant l'anesthésie. L'examen des amphibiens commence par un examen à distance. La fréquence respiratoire, les déplacements, la posture et l'état général pourront être évalués (Mitchell, 2009). Un changement de couleur de la peau et la présence d'ascite sont souvent des signes d'un animal en mauvaise condition (Shumacher, 1996). Les amphibiens tendent naturellement à s'échapper lorsque le manipulateur les approche (Mitchell, 2009); le contraire pourrait être un signe d'un état de santé altéré. L'examen avec contention contient : la cote de chair, l'état de la peau

(présence de bris cutanés ou de mucus), la couleur des muqueuses, l'état d'hydratation et l'examen de la cavité cœlomique par transillumination (si possible) (Shumacher, 1996; Wright, 2001; Mitchell, 2009). Le Doppler permet d'obtenir la fréquence cardiaque en posant la sonde sur l'aspect ventral de l'animal (Mitchell, 2009). Pour compléter l'examen, il faudra tester les réflexes normaux de l'animal afin de pouvoir comparer aux changements durant l'anesthésie (Shumacher, 1996).

Les procédures préanesthésiques diffèrent quelque peu de celles pratiquées chez les mammifères. Elles permettent d'évaluer l'état de santé général de l'amphibien et d'établir les valeurs physiologiques de base avant l'anesthésie.

## 2.3 Médicaments anesthésiants

Différents médicaments anesthésiants et différentes voies d'administration ont été testés chez les anoues avec des degrés de succès variables. La tricaine méthanesulfonate en bain d'immersion reste un des médicaments anesthésiants les plus utilisés en recherche (Green, 2010; Mitchell, 2009).

### 2.3.1 La tricaine méthanesulfonate

La tricaine méthanesulfonate est un méta-amino isomère de la benzocaïne (Downes, 1995) couramment utilisé pour l'anesthésie des amphibiens. C'est un sel soluble dans l'eau qui est le plus souvent administré en bain d'immersion (Green, 2010; Wright, 2001). Il agit directement sur le système nerveux central en inhibant la conduction nerveuse (Cakir & Strauch, 2005; Torreilles et al., 2009). En effet, la molécule se lie sur un site spécifique des canaux sodiques et empêche la formation et la propagation du potentiel d'action (Cakir &

Strauch, 2005; Torreilles et al., 2009). Donc, comme d'autres anesthésiques locaux, dont la lidocaïne et la benzocaïne, la tricaïne méthanesulfonate a un effet réversible sur les canaux sodiques et potassiques lors de la formation et la conduction de l'influx nerveux (Frazier & Narahashi, 1975).

La solution de tricaïne méthanesulfonate est de nature acide et doit être tamponnée avant son administration. La solution acide non tamponnée contient la molécule sous sa forme ionisée qui est non absorbable et qui prolonge donc l'induction de l'anesthésie (Downes, 1995). Un bain d'immersion non tamponné peut être stressant pour l'animal (Cakir & Strauch, 2005) et pourrait causer des lésions cutanées (Mitchell, 2009).

Le métabolisme de la tricaïne méthanesulfonate chez les amphibiens passe par deux réactions. L'hydrolyse du lien ester est la réaction ayant le plus d'effets sur l'anesthésie. Elle produit l'acide meta-aminobenzoïque qui est inactif et termine l'effet anesthésique (Downes, 1995). Des réactions de conjugaisons sont également possibles, mais ne semblent pas réduire l'effet anesthésique comme l'hydrolyse du lien ester (Downes, 1995). Les deux réactions se produisent à différentes proportions selon les espèces (Downes, 1995) ce qui pourrait entraîner des différences anesthésiques entre les espèces.

Le bain d'immersion est la technique privilégiée pour l'administration du MS-222 (Green, 2010). La littérature suggère des doses entre 0,2 g/L et 5 g/L selon l'espèce, l'âge et de la taille de l'amphibien (Mitchell, 2009). Downes (1995) suggère que les concentrations sous 1 g/L devraient être efficaces pour les amphibiens, mais que le temps d'induction devrait rester sous les 30 minutes. Les animaux de même espèce, mais de taille (poids) supérieure demandent plus de temps pour l'induction de l'anesthésie (Cecala et al., 2007). Le MS-222 a



un effet dépresseur sur la fonction respiratoire et il est alors recommandé d'utiliser un oxygénateur dans l'eau pour favoriser les échanges gazeux au niveau de la peau (Downes, 1995).

La tricaïne méthanesulfonate peut également être administrée par une injection intracoelomique. La réponse à l'anesthésie diffère entre les espèces et même entre les individus (Downes, 1995). Pour une anesthésie chirurgicale, Letcher (1992) recommande une dose de 250-400 mg/kg pour les ouaouarons (*Rana catesbeiana*) et 100-250 mg/kg pour les grenouilles *Rana pipiens* (Letcher, 1992). L'effet anesthésiant est optimal aussi tôt que de 10 à 20 minutes après l'induction et l'anesthésie chirurgicale dure de 30 à 60 minutes chez les ouaouarons (*Rana catesbeiana*) (Downes, 1995). Downes (1995) recommande une dose entre 175 et 200 mg/kg lorsque cette technique est utilisée avec une nouvelle espèce.

Il existe très peu d'études sur la pharmacocinétique du MS-222. Chez différentes espèces, le temps de demi-vie est estimé entre 8 et 112 minutes (Downes, 1995). Une étude de pharmacocinétique chez des grenouilles *Rana pipiens* ayant reçu de la tricaïne à 150 mg/kg intracoelomique, révèle un temps de demi-vie d'environ 70 minutes lorsque les grenouilles sont gardées à une température ambiante de 23 ou 37 °C (Wayson et al, 1976). Une baisse de la température ambiante à 7 °C entraîne alors une augmentation du temps de demi-vie à 309 minutes (Wayson et al., 1976). Dans la même étude, le retour du réflexe de recouvrement s'effectue  $113 \pm 28$  minutes après l'induction. Il n'y a pas d'informations sur la pharmacocinétique de la tricaïne méthanesulfonate pour la grenouille *Xenopus laevis*.

La tricaïne méthanesulfonate utilisée comme anesthésiant possède plusieurs avantages, d'où la popularité de son usage chez les amphibiens. Son principal avantage est sa grande

marge de sécurité. Il n'y a que de rares cas de mortalité anesthésique (Downes, 1995). Cependant, une étude sur les grenouilles *Bufo fowleri* a démontré un taux de mortalité de 12 % avec des bains d'immersion de MS-222 de 0,5 g/L; ceci souligne l'importance de vérifier le type d'anesthésie ou le dosage sur une nouvelle espèce avant d'anesthésier plusieurs individus (Cecala et al., 2007). Le MS-222 ayant également un effet analgésiant sur la peau, cela peut être un avantage pour certaines petites manipulations (Downes, 1995). Finalement, la tricaine méthanesulfonate inhibe la croissance de certaines bactéries (dont des bactéries pathogènes et des bactéries secondaires également associées à des maladies) ce qui pourrait limiter les infections opportunistes après les manipulations (ex. : les chirurgies) (Fedewa & Lindell, 2005). Cependant, le médicament peut également limiter le résultat d'une culture bactérienne vu son potentiel bactériostatique (Fedewa & Lindell, 2005).

Le MS-222, comme la plupart des anesthésiques, produit une dépression respiratoire importante pouvant causer l'apnée (Downes, 1995). Cette caractéristique est cependant aussi une caractéristique de la définition d'anesthésie chirurgicale chez les amphibiens et ne semble pas être un désavantage du médicament. Par contre, l'apnée pourrait être un désavantage sérieux chez les grenouilles *Xenopus laevis* qui ont une respiration principalement pulmonaire (Green, 2010). Au niveau cardiovasculaire, de la bradycardie a été observée chez les grenouilles *Rana pipiens* et des concentrations élevées de MS-222 ont aussi prolongé le complexe QRS et le QT sur l'électrocardiogramme (Cakir & Strauch, 2005). Similairement, un effet inotrope et chronotrope négatif a été observé *in vitro* dans les oreillettes de grenouilles *Rana catesbeiana* (Wayson et al., 1976). Ces informations confirment alors l'effet de dépression cardiovasculaire du MS-222. Finalement, il a été rapporté que les humains, les poissons et les amphibiens dont les yeux se retrouvent en contact direct avec la tricaine

méthanesulfonate, pourraient développer des dommages au niveau de la rétine (Bernstein et al., 1997).

La tricaine méthanesulfonate est donc un médicament largement étudié, mais peu d'études concernent les grenouilles *Xenopus laevis*. Les doses à utiliser et leurs effets physiologiques et pharmacologiques ne sont donc pas documentés chez cette espèce.

### 2.3.2 L'eugénol

L'eugénol est un dérivé du phénol trouvé dans l'huile de clou de girofle qui provient de la plante *Eugenia caryophyllata*. Ses propriétés anesthésiques sont bien connues depuis longtemps et il a été notamment utilisé comme anesthésique local en dentisterie (Curtis, 1990). L'eugénol a des propriétés anesthésiques chez les poissons (Guénette et al., 2007), les amphibiens (*Xenopus laevis*) (Guénette et al., 2007) et les rats (Guénette et al., 2006).

L'immersion est, jusqu'à maintenant, la technique d'administration la plus efficace et celle qui donne des effets anesthésiques concluants chez les amphibiens. En effet, l'administration sous-cutanée d'eugénol chez des grenouilles *Xenopus laevis* n'a pas démontré d'effets anesthésiques (Guénette et al., 2007). L'application de gazes topiques de différentes concentrations a eu des effets insatisfaisants sur la perte des réflexes. Par ailleurs, l'application de gazes de 60 et 100 mg/ml d'eugénol (99 % pur) a entraîné de la nécrose cutanée chez les grenouilles *Xenopus laevis* anesthésiées (Ross et al., 2006). À l'histologie, il y avait notamment présence de dégénérescence des glandes de la peau, de la nécrose et l'ulcération de l'épiderme (Ross et al., 2006).

La technique du bain d'immersion à l'eugénol a été évaluée chez la grenouille africaine à griffes (*Xenopus laevis*). Un bain d'immersion de 350 mg/L de 15 minutes produit une anesthésie chirurgicale de 30 minutes ainsi qu'une analgésie de 60 à 180 minutes chez des grenouilles *Xenopus laevis* (Guénette et al., 2007). Un bain d'immersion de 311-318 mg/L (mg d'huile de clou de girofle à 88 % d'eugénol) provoque l'anesthésie chez les grenouilles *Rana pipiens*, mais la durée varie entre les individus (Lafortune et al., 2001). Après une induction de 14 minutes, une anesthésie chirurgicale de 5 à 65 minutes est atteinte et le réveil de l'animal se fait entre 55 et 135 minutes (Lafortune et al., 2001). Il est à noter que dans leur expérience sur les grenouilles *Xenopus laevis*, Guénette et collaborateurs (2007) utilisent l'incision de la peau et des muscles abdominaux pour évaluer l'anesthésie chirurgicale alors que Lafortune et collaborateurs (2001) utilisent la disparition du réflexe de recouvrement et du réflexe de retrait; cela permet difficilement les comparaisons entre les deux études. De plus, les concentrations et la composition des produits primaires d'eugénol sont différentes (99 % eugénol versus huile de clou de girofle à un minimum de 85 % d'eugénol).

Le poids de la grenouille a un effet sur l'anesthésie à l'eugénol par bain d'immersion. Les petites grenouilles ( $7,5 \pm 2,1$  g) *Xenopus laevis* anesthésiées avec 350 mg/L durant 5 minutes ont une anesthésie d'environ 15 minutes; ceci est plus court que l'anesthésie d'environ 30 minutes dont profitent les moyennes ( $29,2 \pm 7,4$  g) et les grosses ( $111,7 \pm 18,3$  g) grenouilles avec des bains d'immersion de 10 et de 15 minutes (respectivement) à la même concentration de médicament anesthésique (Goulet et al., 2010). Goulet et collaborateurs (2010) démontrent que toutes les tailles de grenouilles *Xenopus laevis* réagissent au test à l'acide acétique 30 minutes après l'induction, mais que les petites grenouilles réagissent à l'incision cutanée aussi tôt que 15 minutes après l'induction. Donc, les petites et moyennes

grenouilles sont plus sensibles à des bains d'immersion d'eugénol puisque des temps d'immersion moindres produisent des effets similaires à ceux observés chez des grenouilles adultes.

Le bain d'administration d'eugénol à des concentrations permettant l'anesthésie a plusieurs effets. Il est un dépresseur respiratoire chez les espèces d'amphibiens testées et un dépresseur cardiaque chez la grenouille *Rana pipiens* (Lafortune et al., 2001) et les petites ( $7,5 \pm 2,1$  g) et moyennes ( $29,2 \pm 7,4$  g) grenouilles *Xenopus laevis* seulement (Goulet et al., 2010). L'eugénol ne semble pas avoir d'effet sur le rythme cardiaque des grenouilles *Xenopus laevis* de grande taille (90 à 140 g) (Goulet et al., 2010; Guénette et al., 2007). Il a été rapporté qu'il peut induire des vomissements chez les grenouilles *Xenopus laevis* et le prolapsus gastrique chez les grenouilles *Rana pipiens* (Goulet et al., 2010; Guénette et al., 2007; Lafortune et al., 2001). Le bain d'immersion de 350 mg/L n'a pas d'effet sur la saturation d'oxygène des grenouilles *Xenopus laevis* de petite ou de moyenne taille (Goulet et al., 2010). Le bain d'immersion à 350 mg/L est également toxique lors d'administrations uniques ou multiples de 10 minutes chez les grenouilles *Xenopus laevis* de moyenne taille ( $28,2 \pm 13,7$  g) (Goulet et al., 2011) alors que l'histologie des organes des *Xenopus laevis* de grande taille (90 à 140 g), induites à la même concentration durant 15 minutes, 24 heures après l'anesthésie, est normale (Guénette et al., 2007). Chez les grenouilles de moyenne taille, euthanasiées 24 heures après une anesthésie unique, l'apoptose légère à modérée des cellules tubulaires des reins est l'effet indésirable le plus fréquent lors de l'anesthésie (Goulet et al., 2011). Lors de multiples administrations (une fois par jour durant 3 jours), de l'apoptose légère à sévère des cellules tubulaires rénales, des membranes hyalines pulmonaires ainsi que de la nécrose hépatique peuvent être notées (Goulet et al., 2011). Suite à une période de récupération d'une semaine,

ces mêmes grenouilles (administrations uniques ou multiples) ont démontré de la régénération des cellules tubulaires rénales et quelques membranes hyalines pulmonaires (Goulet et al., 2011). Après une semaine, les grenouilles *Xenopus laevis* qui ont subi de multiples administrations démontraient également de la nécrose hépatique (plus d'individus affectés que 24 heures après l'anesthésie) et des membranes hyalines pulmonaires plus marquées (Goulet et al., 2011). Le foie et les reins semblent alors être les organes principaux impliqués dans la clairance de l'eugénol par les grenouilles *Xenopus laevis* lors du bain d'immersion et sont donc les plus affectés. Les effets rénaux semblent réversibles à court terme pour des administrations uniques ou multiples chez les grenouilles de moyenne taille.

Lorsqu'utilisé en bain d'immersion, l'eugénol semble être un médicament anesthésique adéquat dans la mesure où sont respectés des temps d'immersion et des concentrations préétablies. Par contre, il peut aussi induire des effets toxiques chez les grenouilles *Xenopus laevis* de moyenne taille aux doses étudiées.

### 2.3.3 La benzocaïne

La benzocaïne est un anesthésique topique pratique puisqu'il est peu dispendieux et trouvé en pharmacie (Orajel®, Church & Dwight Co., Canada). Il est facile à transporter et à appliquer, mais il doit être préalablement dilué dans l'éthanol avant d'en faire une solution avec de l'eau. Il agit de la même façon que le MS-222 sur les canaux sodiques afin d'inhiber la formation et la propagation du potentiel d'action (Torreilles et al., 2009). Le métabolisme de la benzocaïne est semblable à celui de la tricaïne méthanesulfonate (Downes, 1995).

La benzocaïne peut être utilisée directement de façon topique. Le produit est appliqué directement sur la tête ou plus efficacement sur l'abdomen ventral de l'animal, en quantité qui varie selon la grosseur de l'individu (Chen & Combs, 1999). Ces techniques sont par contre plus utilisées pour l'euthanasie de l'animal puisqu'il est difficile de contrôler la quantité administrée.

Il est également possible d'utiliser le bain d'immersion afin d'administrer la benzocaïne. En général, il est recommandé d'utiliser des doses de 200-300 mg/L (Cakir & Strauch, 2005). Le bain d'immersion de benzocaïne à 200 mg/L nécessite une induction d'anesthésie plus courte et produit une durée d'anesthésie plus longue que le bain d'immersion de MS-222 à 0,5 g/L chez plusieurs espèces; cependant, des variations sont notées entre les espèces (Cecala et al., 2007).

La benzocaïne a également un effet dépressur sur le système cardiovasculaire et sur le système respiratoire (Cakir & Strauch, 2005). À une concentration de 200 mg/L, chez les grenouilles *Bufo fowleri*, l'anesthésie a causé un taux de mortalité de 35 %, renforçant l'importance d'évaluer les médicaments sur un petit nombre d'animaux d'une espèce avant de l'utiliser à grande échelle (relation dose-effet-concentration) (Cecala et al., 2007). La benzocaïne peut causer de la méthémoglobinémie chez les mammifères, mais cet effet n'a pas été rapporté chez les amphibiens (Downes, 1995).

La benzocaïne topique ou administrée par bain d'immersion est une méthode d'anesthésie adéquate chez plusieurs espèces d'amphibiens. Plus de recherche est nécessaire puisque les effets anesthésiques sont différents entre les espèces et plusieurs des études publiées jusqu'à maintenant portent sur l'euthanasie des amphibiens.

#### 2.3.4 Autres médicaments anesthésiants des anoures

Plusieurs autres médicaments ont été évalués sur différentes espèces d'amphibiens avec différents degrés de succès ou de niveau d'anesthésie. De ces médicaments, il y a notamment le pentobarbital, l'isoflurane, le propofol, la médétomidine, la tiletamine, la kétamine et le méthoxyflurane.

Le pentobarbital semble efficace chez la grenouille *Rana pipiens*. Il faut cependant être prudent puisque les marges de sécurité sont minces. Le bain d'immersion de pentobarbital à 300 mg/L produit une anesthésie avec perte du réflexe de recouvrement et du réflexe de retrait (Cakir & Strauch, 2005). Il induit également une apnée marquée (Cakir & Strauch, 2005). Le pentobarbital a été évalué chez cette espèce par la voie intralymphatique (60 mg/kg), mais malgré un niveau d'anesthésie chirurgical, le réveil peut prendre jusqu'à neuf heures et la relaxation musculaire n'est pas adéquate durant l'anesthésie (Kaplan, 1969).

Plusieurs voies d'administration ont été évaluées pour l'anesthésie des amphibiens à l'isoflurane. Les voies sous-cutanée et intracoelomique peuvent produire l'anesthésie, mais les résultats de profondeur d'anesthésie et de durée sont très variables d'un individu à l'autre (Smith & Stump, 2000). L'injection intramusculaire, chez la grenouille *Xenopus laevis*, ne produit pas d'anesthésie à des doses entre 0,02 et 0,10 ml/g (Smith & Stump, 2000). L'utilisation de gaz dissout dans l'eau semble avoir des résultats mitigés. En effet, Smith et collaborateurs (2000) trouvent la voie d'administration inefficace tandis que Stetter (1996) remarque un temps d'induction long combiné à un réveil rapide avec le gaz. La voie topique est la plus efficace quoiqu'elle offre un temps d'anesthésie chirurgicale très court. Il est



possible d'administrer l'isoflurane topique à l'aide d'une gaze saturée en isoflurane à une dose entre 0,02 et 0,04 mL/g ou à l'aide d'un mélange de 3,5 mL de gelée K-Y®, 3 mL d'isoflurane et 1,5 mL d'eau où 0,025 mL/g est appliqué aux grenouilles *Xenopus laevis* (Smith & Stump, 2000; Stetter et al., 1996).

La kétamine est un médicament anesthésique utilisé chez les amphibiens. En injection intramusculaire, des doses entre 20 et 210 mg/kg ont été utilisées (Wright, 2001), mais le temps d'induction et les effets semblent très variables selon les espèces (Wright, 1996). L'utilisation de la kétamine intramusculaire pour une anesthésie chirurgicale induite en 15 à 20 minutes a été publiée pour les amphibiens *Litoria caerulea* (Vogelnest, 1994a), *Litoria infrafrenata* (Vogelnest, 1994b) et *Amphiuma means* (Wright, 1994) à des doses entre 70 et 120 mg/kg. Le réveil est long lorsque la kétamine est utilisée chez les amphibiens et peut prendre jusqu'à 18 heures (Wright, 1994; Wright, 2001).

Le propofol n'est pas un bon médicament pour l'anesthésie chirurgicale des amphibiens. Lorsqu'il est utilisé périvasculaire (10mg/kg) dans le plexus sublingual ou à l'aide d'un bain d'immersion (88 mg/L), le propofol produit une sédation, mais le niveau d'anesthésie est superficiel, la durée de l'anesthésie est courte et les marges de sécurité semblent minces (Guénette et al., 2008; Lafortune et al., 2001). La voie intracœlomique (30 mg/kg) a été testée chez un individu amphibien (*Pelodytes caerulea*) avec succès (Von Esse & Wright, 1974), il faudra par contre l'évaluer sur un plus grand nombre d'individus avant d'en tirer des conclusions.

La médétomidine n'a pas d'effet anesthésique chez les amphibiens. À une dose de 150 µg/kg administrée par la voie intramusculaire chez la grenouille *Rana pipiens*, le médicament ne produit pas d'anesthésie ni de sédation (Lafortune et al., 2001).

La combinaison tiletamine/zolazepam a été testée sur les ouaouarons (*Rana catesbeiana*) et les grenouilles léopards (*Rana pipiens*). Avec une administration intramusculaire de doses entre 5 et 50 mg/kg, les effets de la combinaison de médicaments sont variables (Letcher & Durante, 1995). Également, la perte des réflexes et un niveau d'anesthésie constant ne peuvent pas être garantis (Letcher & Durante, 1995). Le temps de réveil peut se prolonger au-delà de 32 heures lorsqu'une dose de 20 mg/kg est utilisée (Letcher & Durante, 1995). La tiletamine/zolazepam n'est donc pas une combinaison anesthésique convenable chez les amphibiens lorsqu'elle est utilisée par la voie intramusculaire.

Le méthoxyflurane a également été évalué chez les amphibiens. Lorsqu'administré par évaporation (technique « *cotton-jar* »), le méthoxyflurane induit l'anesthésie en 2 à 5 minutes, mais il produit un réveil qui peut durer plus de 7 heures (Wass & Kaplan, 1974).

Le propofol, la combinaison tiletamine/zolazepam, le méthoxyflurane et la médétomidine ne sont pas considérés comme des médicaments adéquats pour l'anesthésie chirurgicale aux doses et aux voies d'administration étudiées chez les amphibiens. Alors que certains médicaments offrent un niveau d'anesthésie inadéquat, d'autres offrent un réveil beaucoup trop long. Le pentobarbital semble être un médicament adéquat chez certaines espèces, mais avec des marges de sécurité très minces. La kétamine intramusculaire semble être une option raisonnable pour l'anesthésie des amphibiens, mais le choix de doses est large

et le réveil peut être long. Finalement, l'application d'isoflurane topique semble être une bonne alternative pour les procédures de courte durée chez les grenouilles *Xenopus laevis*.

## 2.4 Évaluation et surveillance de l'anesthésie

### 2.4.1 Évaluation des réflexes

Afin de déterminer les effets d'un médicament anesthésique sur un individu, il est possible d'utiliser plusieurs paramètres dont les réflexes. Les réflexes de retrait et de recouvrement sont le plus souvent utilisés puisque c'est après leur disparition que les amphibiens sont considérés comme anesthésiés. Le réflexe de retrait est induit lorsqu'une phalange de l'animal est pincée et que celui-ci tente de retirer le membre pincé (Wright, 2001; Mitchell, 2009). Le réflexe de recouvrement se produit lorsque l'animal est placé en décubitus dorsal et que celui-ci se replace rapidement par lui-même en position normale, soit en décubitus ventral (Mitchell, 2009). Il est aussi possible d'évaluer le réflexe cornéen et le réflexe de fuite (Wright, 2001; Mitchell, 2009), mais ils sont peu utilisés lors de l'évaluation des effets des médicaments anesthésiques sur les amphibiens.

Le test à l'acide acétique est un autre test utilisé par plusieurs chercheurs pour déterminer la profondeur de l'analgésie chez les animaux anesthésiés (Stevens, 2004). L'acide acétique stimule, chez les amphibiens, les nocicepteurs et les récepteurs mécaniques à faible seuil (Hamamoto & Simone, 2003). Une concentration prédéterminée d'acide acétique est déposée, à l'aide d'une pipette, sur le membre postérieur pour environ deux secondes, puis est rincée avec de l'eau déchlorinée si la grenouille ne tente pas d'essuyer la goutte avec son autre membre. Puis, d'autres concentrations d'acide acétique sont testées (en ordre croissant de

concentrations) jusqu'à ce qu'un réflexe soit noté. Le test se termine lorsqu'une réponse survient (Stevens, 2004).

Au niveau de l'analgésie cutanée, il est également possible d'utiliser le test de Hargreaves chez les grenouilles *Xenopus laevis*. Ce test utilise une stimulation nociceptive thermique au lieu de chimique telle que vue avec le test à l'acide acétique. La grenouille est placée dans un contenant de verre et s'y acclimata sans manipulation ou stimulation (Coble et al., 2011). Puis, un faisceau de lumière de haute densité est dirigé au travers du contenant, sur la cuisse de l'animal. Le temps est calculé entre le moment où le faisceau est dirigé sur la cuisse de l'animal et le moment où l'animal effectue un mouvement (Coble et al., 2011). Si l'animal ne bouge pas, le test s'arrête après un laps de temps prédéfini, soit une trentaine de secondes dans la validation du test de Hargreaves chez les grenouilles *Xenopus laevis* publiée par Coble et collaborateurs (2011).

Il est donc possible d'utiliser les réflexes de recouvrement et de retrait pour évaluer la profondeur de l'anesthésie des grenouilles alors que le test à l'acide acétique et le test de Hargreaves nous indiquent le niveau d'analgésie.

#### 2.4.2 Évaluations cardiovasculaire et respiratoire

L'évaluation des fonctions cardiovasculaire et respiratoire est essentielle à l'attestation de la profondeur de l'anesthésie ainsi qu'à une surveillance anesthésique adéquate.

Pour l'évaluation cardiovasculaire, le Doppler est facile à utiliser chez la grenouille en apposant la sonde munie de gel sur l'aspect ventral de l'animal. Il est alors important de bien rincer le gel sur la peau de l'animal entre chaque lecture pour éviter d'irriter celle-ci (Mitchell,

2009). Guénette et collaborateurs (2007) utilisent également la sonde du Doppler sans gel. Il est possible d'utiliser l'électrocardiogramme pour un suivi de la fonction cardiaque durant l'anesthésie. Afin d'éviter d'endommager la peau, l'utilisation des aiguilles hypodermiques est préconisée à l'instar des pinces crocodiles (Mitchell, 2009). L'intervalle QT étant un marqueur hypoxie du myocarde, il est alors préférable de choisir des médicaments dont l'effet est moindre sur ce paramètre (ex. : MS-222) (Cakir & Strauch, 2005). La fréquence cardiaque des grenouilles *Xenopus* est variable selon la température du milieu ambiant; elle peut être de 8 battements/minute à une température de deux degrés Celsius et d'environ 40 à 60 battements/minute à 25 degrés Celsius (Green, 2010). La fréquence cardiaque normale des amphibiens se situe généralement entre 25 et 80 battements/minute (Mitchell, 2009). Il est donc essentiel de recueillir des données de base préanesthésiques et de conserver les conditions environnementales constantes afin de pouvoir surveiller adéquatement l'anesthésie.

L'évaluation du système respiratoire se fait par l'observation directe de l'animal. En effet, les mouvements gulaires, abdominaux et les mouvements des narines peuvent être observés directement. La fréquence respiratoire est très variable chez les grenouilles *Xenopus laevis* (Green, 2010). Guénette et collaborateurs (2007; 2008) observent une fréquence respiratoire préanesthésique variant entre environ 20 et 40 respirations/minute chez des grenouilles *Xenopus laevis* (90 à 140 g) gardées à une température d'environ  $21 \pm 2$  degrés Celsius. Rappelons également que l'anesthésie chirurgicale est caractérisée par la cessation des mouvements respiratoires abdominaux et la diminution ou l'arrêt des mouvements gulaires (Crawshaw, 1993).

Il est possible d'évaluer la saturation en oxygène en utilisant un oxymètre de pouls chez les amphibiens. Bien qu'il n'y ait pas de valeurs normales publiées chez les amphibiens,

ils ont normalement des valeurs de saturation en oxygène plus basses que les mammifères (Wright, 2001). Il est donc important de mesurer des valeurs de base afin de suivre la progression de la saturation en oxygène.

Comme chez les mammifères, l'évaluation des systèmes cardiovasculaire et respiratoire chez les amphibiens est possible et elle est essentielle à la surveillance anesthésique.

#### 2.4.3 Électroencéphalographie chez les amphibiens

Les neurones créent de l'activité électrique par la production de potentiels d'action et via l'activité synaptique, excitatrice ou inhibitrice, produite par les neurotransmetteurs. La somme des activités synaptiques produites par plusieurs neurones est mesurée par l'électroencéphalographie (EEG) (Lopes da Silva, 2010). L'activité des neurones crée alors un champ électrique qui peut être saisi par des électrodes placées sur l'animal (Lopes da Silva, 2010).

Les électrodes, faites de différents matériaux conducteurs, peuvent être placées à différents niveaux sur l'animal et de façon à obtenir un enregistrement unipolaire ou bipolaire. Il faut d'abord décider où seront placées les électrodes. Des électrodes de surface collées directement sur la peau du crâne des mammifères sont utilisées pour limiter les manipulations chirurgicales et anesthésiques, mais elles empêchent l'enregistrement de certaines hautes fréquences et produisent un signal contaminé (signaux électriques musculaires, mouvements des yeux...) (Mukamel & Fried, 2012). Les électrodes de surface ont l'avantage de ne pas être invasives pour les animaux. Il est également possible d'implanter chirurgicalement des

électrodes sous-durales ou intracrâniennes/intracorticales. En plus des manipulations chirurgicales et anesthésiques nécessaires à l'implantation de ces électrodes, elles peuvent causer des effets secondaires tels que les hémorragies cérébrales et l'œdème cérébral (Yuan et al., 2012). Les électrodes sous-durales ou intracrâniennes offrent un signal plus clair et plus complet au niveau des hautes fréquences d'EEG. L'implantation chirurgicale du système d'EEG chez les amphibiens diffère selon les études. Alors que certains percent des trous sur le crâne pour implanter des vis ou des fils afin d'atteindre différentes régions du cerveau (Blisard et al., 1994; Fang et al., 2012; Laming, 1982), d'autres préfèrent enlever la calotte du crâne et placer directement les électrodes sur le tissu nerveux (Ono et al., 1980). Les trous percés sur le crâne permettent d'utiliser un adhésif (tel le ciment dentaire) pour fixer les électrodes, permettant ainsi de réveiller l'animal pour obtenir un signal d'EEG en état d'éveil (Laming, 1982).

Les électrodes peuvent être montées de façon unipolaire ou bipolaire. Un enregistrement bipolaire est un montage où le signal provient de la différence de potentiel entre une paire d'électrodes (Kiloh et al., 1972). Un enregistrement unipolaire représente le signal électrique d'une seule électrode et d'une électrode de référence qui sera commune à toutes les autres électrodes. L'électrode de référence doit être placée de façon stratégique afin de recevoir peu de signaux du cerveau, mais devra également avoir le moins de signaux électriques d'autres sources, telles que le cœur (Kiloh et al., 1972). Finalement, l'électrode doit être faite d'un matériau qui conduit bien les signaux électriques et ne doit pas être toxique. Quelques exemples communs de métaux utilisés pour la fabrication d'électrodes pour les enregistrements d'EEG chez les amphibiens et chez d'autres animaux sont : l'argent (ou argent/chlorure d'argent) (Ekström et al., 1993; Laming, 1982; Vachon et al., 1999), l'acier

inoxydable (Fang et al., 2011, 2012; Hudetz et al., 2011) et le platine (Blisard et al., 1994). Les électrodes d'argent ou de chlorure d'argent implantées de façon chronique peuvent causer de la toxicité tissulaire (Dymond et al., 1970). Alors que la plupart des matériaux utilisés sont adéquats pour la détection de hautes fréquences, l'argent et la combinaison argent/chlorure d'argent sont de bons matériaux pour la détection de basses fréquences comparés au platine et à l'acier inoxydable (Tallgren et al., 2005). Lors de tests effectués *in vitro*, un des désavantages de l'acier inoxydable était qu'il génère plus de bruits que la plupart des autres matériaux (Tallgren et al., 2005). Il est à noter que plusieurs autres métaux (dont l'or) et alliages peuvent également être utilisés pour la confection d'électrodes. Finalement, il est possible de couvrir les électrodes avec des matériaux isolants. Cela permet, entre autres, de diminuer la présence d'artéfacts de contact et d'avoir une meilleure résolution de l'activité électrique localisée (Tallgren et al., 2005). En somme, le choix de l'emplacement des électrodes et de leur composition dépend de son usage, du but de l'étude et de la qualité du signal désirée. Le signal brut de l'EEG contient une multitude d'informations difficiles à extraire d'où l'importance d'avoir un signal libre de contaminants.

Plusieurs paramètres peuvent être utilisés pour l'analyse de l'EEG. Les paramètres classiques sont : la fréquence maximale, la fréquence médiane, le front de fréquence spectrale et les bandes de fréquences (Tonner & Bein, 2006). Afin d'utiliser ces paramètres, le signal brut est analysé sous toutes ses composantes afin de faire un graphique de la puissance du signal sur sa fréquence; cette analyse est l'analyse du spectre de puissance ou la transformation de Fourier (Tonner & Bein, 2006). La fréquence maximale sur l'analyse du spectre de puissance consiste à trouver la fréquence pour laquelle il y a le plus de puissance (Tonner & Bein, 2006). La fréquence maximale a tendance à diminuer chez les individus



anesthésiés (Tonner & Bein, 2006). La fréquence médiane est la fréquence à laquelle 50 % de la puissance du signal se retrouve dans les hautes fréquences et 50 % dans les basses fréquences; il est ensuite possible, pour certaines espèces et certains médicaments anesthésiques, de déterminer et de suivre la fréquence médiane en état d'éveil (plus élevée) et sous anesthésie (plus basse) (Tonner & Bein, 2006). Le front de fréquence spectrale est calculé en utilisant l'aire sous la courbe du spectre de puissance, puis en déterminant la fréquence lorsque la puissance est, par exemple, entre 90 % et 10 % (SEF90) (Tonner & Bein, 2006). Le front de fréquence peut être ensuite utilisé pour démontrer la profondeur de l'anesthésie (Otto et al., 2012; Vachon et al., 1999). La transformation de Fourier nous permet aussi de calculer l'aire sous la courbe du graphique pour différentes fréquences, ce qui nous permet d'analyser notre EEG en utilisant des bandes de fréquence (Tonner & Bein, 2006). Les bandes de fréquence analysées sont les bandes : delta (0-4 Hz), thêta (4-8 Hz), alpha (8-13 Hz) et bêta (13-32 Hz) (Tonner & Bein, 2006; Vachon et al., 1999). La prédominance de bandes delta et de bandes thêta est signe d'une anesthésie profonde chez les chevaux (Otto & Short, 1991). Une transition de prédominance de bandes bêta à une prédominance de bandes delta se fait avec une profondeur d'anesthésie croissante chez plusieurs espèces anesthésiées avec différents médicaments (Ekström et al., 1993; Otto & Short, 1991; Vachon et al., 1999). Il existe des paramètres d'analyse d'EEG plus récents, dont l'index bispectral, l'index Narcotrend, l'index de conscience et l'entropie qui ont été étudiés et comparés aux paramètres classiques chez les lapins (Silva et al., 2011) et les moutons (Otto et al., 2012). Tous ces paramètres (classiques ou nouveaux) ont une spécificité et une sensibilité propre à l'espèce et au médicament utilisé. Par contre, ils ont des tendances prévisibles et peuvent permettre une

surveillance de la profondeur d'anesthésie plus adéquate lorsqu'ils sont utilisés en combinaison.

L'utilisation de l'électroencéphalogramme pour qualifier l'état d'anesthésie a été publiée chez plusieurs espèces, dont l'homme (Grocott et al., 2010), le mouton (Otto et al., 2012), le lapin (Vachon et al., 1999; Silva et al., 2011), le cheval (Ekström et al., 1993; Otto & Short, 1991) et le rat (Hudetz et al., 2011). Alors que l'EEG est également utilisé chez certains amphibiens, il n'a pas été utilisé pour caractériser l'anesthésie ou l'effet de médicaments anesthésiques.

Les études d'électroencéphalographie chez les amphibiens sont nombreuses dans le domaine de la recherche sur le comportement. En effet, les chercheurs tentent de caractériser des bandes de fréquence d'EEG propres aux amphibiens. Par exemple, à l'état d'éveil chez les grenouilles *Bufo regularis*, il y a augmentation de la fréquence et/ou de l'amplitude du signal de l'EEG (Laming, 1982). Selon Laming (1982), il serait plus évident de voir une augmentation d'amplitude chez l'amphibien éveillé qu'une augmentation de fréquence du signal. Plus récemment, une étude sur les grenouilles *Babina daunchina* a révélé la présence de 4 bandes de fréquence en état d'éveil et 3 bandes de fréquence en état de sommeil différentes de celles présentes chez les mammifères (Fang et al., 2012). Les signaux de hautes fréquences sont plus caractéristiques de l'état d'éveil chez les amphibiens alors que les basses fréquences de 12 à 14 Hz semblent plus présentes lors du sommeil (Fang et al., 2012). Il a été également observé chez les grenouilles *Babina daunchina* que les changements hormonaux qui induisent les comportements de reproduction semblent changer significativement les bandes de fréquence selon la région du SNC observée (Fang et al., 2011).

L'électroencéphalogramme a également été utilisé pour caractériser la susceptibilité des amphibiens aux convulsions induites expérimentalement dans des modèles d'épilepsie. Différents agents convulsants et la stimulation électrique ont été étudiés afin d'observer si l'activité au niveau de l'EEG durant les convulsions chez les amphibiens *Rana pipiens* et *Rana nigromaculata* est semblable à celle observée chez les mammifères et les humains (Blisard et al., 1994; Ono et al., 1980). Finalement, l'EEG a également été utilisé chez la grenouille *Rana tigrina* afin de démontrer que l'empoisonnement aigu aux organophosphorés a un effet sur l'activité électrique du SNC (Balasandaram et al., 1997).

Bien que des données aient été publiées sur l'état de sommeil et d'éveil de certaines espèces d'amphibiens et qu'il n'y ait pas d'étude publiée sur les signaux et les paramètres d'EEG lors de l'anesthésie, ces articles suggèrent qu'il devrait y avoir une dépression du système nerveux central lors de l'anesthésie des grenouilles et que la majorité de l'activité électroencéphalographique devrait se retrouver dans les basses fréquences.

## 2.5 Procédures postanesthésiques

Les amphibiens nécessitent également une surveillance adéquate lors de la période de réveil. Un retour trop hâtif à l'eau sans le retour complet des réflexes, sans le retour de la fonction respiratoire et sans une position sternale peut entraîner une noyade (Green, 1979; Mitchell, 2009). Après un bain d'immersion ou toute autre application topique, l'animal est rincé à l'eau déchlorinée pour enlever toute molécule résiduelle (Green, 1979; Stetter, 2001). Il est important de garder l'animal humide en tout temps pour éviter la dessiccation (Schumacher, 1996) et conserver les propriétés protectrices de la peau. Comme chez les

mammifères, le suivi des systèmes cardiaque et respiratoire doit se continuer jusqu'au réveil complet de l'animal.

La température ambiante semble être idéale pour le réveil (Stetter, 2001), alors que d'autres voient une accélération marquée du réveil à 24-26 °C (Green, 1979). Il n'est cependant pas recommandé de trop augmenter la température dans le but d'accélérer le métabolisme puisqu'il en résulte une demande en oxygène plus importante chez l'animal en réveil (Stetter, 2001). Dans un même ordre d'idées, l'air ambiant facilite le retour à une respiration normale alors que la supplémentation en oxygène pur empêche un niveau d'hypercapnie suffisant et essentiel au retour de la fonction respiratoire (Wright, 2001).

Il est donc important de garder un suivi postanesthésique adéquat pour éviter les complications et les noyades durant la période de réveil des amphibiens. Pour un réveil rapide, l'air et la température ambiants semblent être essentiels.

### *3. Euthanasie des amphibiens*

#### *3.1 Définition d'euthanasie*

L'American Veterinary Medical Association définit l'euthanasie comme l'acte d'induire une mort sans douleur ni détresse chez un animal (American Veterinary Medical Association, 2013). L'euthanasie comporte les éléments suivants :

- Une absence de douleur et de détresse (le plus possible),
- Une perte de conscience rapide,
- Un arrêt cardiaque et respiratoire,
- Une perte de la fonction cérébrale (American Veterinary Medical Association, 2013).

L'euthanasie doit être irréversible, fiable, rapide, vérifiable et sécuritaire pour le personnel présent (Charbonneau et al., 2010). Si l'animal est déjà sous anesthésie et qu'il ne ressent pas de stress ni de douleur, les choix sont alors plus nombreux et certaines méthodes physiques deviennent acceptables (American Veterinary Medical Association, 2013).

Le choix du médicament et de la méthode d'administration est donc une étape primordiale. Une connaissance approfondie de l'espèce à euthanasier est requise.

### 3.2 Méthodes chimiques

#### 3.2.1 Surdose de tricaine méthanesulfonate

La surdose de tricaine méthanesulfonate est un des moyens fréquemment suggérés pour l'euthanasie des amphibiens. Les voies d'administration chez les amphibiens sont habituellement le bain d'immersion et l'injection intracoelomique.

L'immersion d'amphibiens dans le MS-222 peut être déroutante lors du choix de la concentration du médicament. En effet, la littérature nous suggère des doses entre 250 et 10 000 mg/L et des temps d'exposition qui varient selon la dose utilisée (Green, 2010; Torreilles et al., 2009; Wright, 2001). Alors que ces doses semblent fonctionner pour la plupart des utilisateurs, Torreilles et collaborateurs (2009) démontrent que l'immersion de grenouilles *Xenopus laevis* dans un bain de tricaine méthanesulfonate de 5 g/L pendant une heure provoque la perte de conscience alors que l'arrêt du cœur des grenouilles s'observe uniquement 1 à 3 heures suivant le bain. Une concentration de 3 g/L causera l'arrêt du cœur environ 5 heures plus tard (Torreilles et al., 2009). Les doses de 1 et 2 g/L s'avèrent inefficaces chez certaines grenouilles *Xenopus laevis* puisque le processus peut être réversible

avec la dose de 1 g/L et que le cœur peut cesser de battre après plus de 20 heures pour les deux doses (Torreilles et al., 2009).

L'administration de MS-222 intracoelomique à des fins d'euthanasie est mitigée. En effet, certains auteurs suggèrent d'utiliser une dose de 200 mg/kg de tricaine méthanesulfonate (Wright, 2001) alors qu'une dose de 2590 mg/kg de MS-222 utilisée par voie intracoelomique chez des grenouilles *Xenopus laevis* s'est montrée partiellement réversible (retour des réflexes après 1.5 et 3 heures) chez plusieurs individus (Torreilles et al., 2009). Il est donc inadéquat d'utiliser le MS-222 intracoelomique à des doses aussi élevées que 2590 mg/L afin d'euthanasier des grenouilles *Xenopus laevis*. L'euthanasie utilisant la voie intracoelomique chez certains reptiles (*Sceloporus occidentalis*, *Dipsosaurus dorsalis*, *Thamnophis ssp*, *Hemidactylus frenatus* et *Hemidactylus platyurus*) a été possible en utilisant une première injection anesthésiante de MS-222 de 250 à 500 mg/kg (0.7 - 1 %) suivi d'une seconde injection euthanasiante de 50 % MS-222 (différents volumes selon l'espèce) (Conroy et al., 2009).

L'euthanasie des amphibiens au MS-222 est donc efficace en bain d'immersion à une concentration de 3 à 5 mg/L, cependant le processus est long puisque l'arrêt cardiaque est constaté après plusieurs heures.

### 3.2.2 Surdose de benzocaïne

La benzocaïne est un médicament pratique utilisé pour l'euthanasie des amphibiens. Elle peut être administrée à l'aide d'un bain d'immersion ou par une application topique directement sur l'animal.

L'application topique de benzocaïne peut se faire sur la tête de l'amphibien (Altig, 1980) ou plus efficacement sur l'aspect ventral de l'animal, soit au niveau pelvien chez les anoures (Chen & Combs, 1999). Des produits en gelée (ex. : Orajel®, Church & Dwight Co., Canada) à des concentrations entre 7.5 et 20 % sont utilisés pour cette technique. Les quantités à appliquer sont plutôt empiriques, mais elles semblent croissantes plus l'animal ou l'espèce est de grande taille (Chen & Combs, 1999). Avec une application topique de benzocaïne 20 % (182 mg/kg) chez la grenouille *Xenopus laevis* (environ 2 cm sur 1 mm), l'arrêt cardiaque se produit près de trois heures après l'application (Torreilles et al., 2009).

L'application topique de benzocaïne est une méthode utile et efficace d'euthanasie chez les amphibiens. Les doses utilisées et étudiées sont cependant très variables et difficiles à déterminer.

### 3.2.3 Barbituriques

L'administration de pentobarbital à une dose induisant l'euthanasie est une méthode acceptable et courante d'euthanasie chez les amphibiens (Torreilles et al., 2009). Le pentobarbital agit principalement comme agoniste sur les récepteurs GABA, inhibant l'activité neuronale (Torreilles et al., 2009). L'injection intracardiaque permet une mort rapide alors que les voies intracoelomique et intralymphatique causent la mort après plus de 30 minutes (Wright, 2001). Alors que la littérature générale conseille l'injection de 100 mg/kg de pentobarbital sodique (Wright, 2001; AVMA, 2007), une dose intracoelomique de 1100 mg/kg de pentobarbital sodique combinée à 141 mg/kg de phénytoïne sodique permet d'induire

l'arrêt cardiaque chez la grenouille *Xenopus laevis* en 1 à 3 heures (Torreilles et al., 2009). Donc, des doses importantes semblent nécessaires pour l'euthanasie des grenouilles.

Les effets indésirables de l'euthanasie au pentobarbital sont les dommages au myocarde après l'administration intracardiaque et des dommages tissulaires pouvant interférer avec les interprétations histopathologiques (Wright, 2001).

En utilisant l'euthanasie au pentobarbital, l'arrêt cardiaque se produit rapidement comparativement à d'autres médicaments. Cette méthode serait alors une méthode efficace d'euthanasie individuelle des grenouilles africaines à griffes et potentiellement d'autres amphibiens. D'autres barbituriques ne semblent pas avoir été évalués pour l'euthanasie des amphibiens.

### 3.3 Méthodes physiques

#### 3.3.1 Décérébration et décapitation

Il est acceptable d'utiliser certaines méthodes physiques d'euthanasie telles que la décérébration et la décapitation si l'animal est préalablement anesthésié. La décapitation consiste simplement en une coupure franche et rapide de la tête de l'amphibien faite à l'aide d'une guillotine ou de gros ciseaux (Green, 2010). La décérébration (« *pithing* ») demande plus d'habiletés techniques puisque cette technique consiste à endommager la moelle épinière à la base du cerveau en utilisant une aiguille. L'aiguille est insérée dans le foramen magnum en direction rostrale (Wright, 2001; Green 2010) et bougée rapidement pour détruire le cerveau (Green, 2010). L'aiguille est ensuite redirigée en direction caudale dans le canal vertébral pour détruire le tronc cérébral (Wright, 2001). La procédure doit être suivie par une



décapitation puisque la mort peut ne pas être immédiate (Green, 2010). Il pourrait y avoir une activité résiduelle du tronc cérébral permettant l'activité des organes vitaux.

Si la décapitation ou la décérébration sont effectuées selon les techniques établies, elles sont alors des techniques d'euthanasie physiques acceptables.

### 3.3.2 Congélation

La congélation lente (ex. amphibien mis au congélateur) n'est pas une méthode d'euthanasie acceptable. Cette méthode est considérée comme lente (Wright, 2001), douloureuse (Green, 2010) et elle produit la formation de cristaux de glace dans les tissus (American Veterinary Medical Association, 2013). Certaines espèces peuvent même être tolérantes à la congélation pendant plusieurs heures (Wright, 2001).

Par contre, une congélation rapide est une méthode acceptée d'euthanasie. La congélation doit être faite dans l'azote liquide chez un animal préalablement anesthésié (Wright, 2001).

Il est donc acceptable d'euthanasier un amphibien préalablement anesthésié par congélation rapide alors qu'il n'est jamais acceptable d'euthanasier un amphibien par congélation lente considérant la douleur et la réversibilité de cette méthode.

## 4. *Introduction à la pharmacocinétique des anesthésiques*

La pharmacocinétique est l'étude du devenir quantitatif d'un médicament dans le corps sur le temps (O'Donnell et al., 2012). Elle comprend les phases d'absorption, de distribution,

de métabolisme et d'élimination des médicaments. Elle nous indique comment le corps de l'animal agit sur le médicament (O'Donnell et al., 2012) et nous permet d'utiliser diverses formules mathématiques et concepts pour prédire des concentrations de molécules dans la circulation générale (KuKanich, 2011). Les principaux paramètres de la pharmacocinétique sont la biodisponibilité (F), le volume de distribution ( $V_d$ ), la clairance (Cl) et le temps de demi-vie d'élimination ( $T_{1/2}$ ) (KuKanich, 2011).

Dans un ordre chronologique d'évènements, le médicament est premièrement absorbé lors de l'administration, il se retrouve donc dans la circulation générale sous sa forme intacte ou métabolisée. La biodisponibilité (F) d'un médicament indique la vitesse et l'étendue de l'absorption du médicament (Tozer & Rowland, 2006). Elle représente donc la proportion du médicament qui atteint ou qui est disponible au site d'action (Gunaratna, 2001). La biodisponibilité est en outre influencée par la voie d'administration et la forme chimique du médicament (LaMattina & Golan, 2008). Idéalement, cela se fait à une concentration permettant d'avoir l'effet désiré par le médicament. À l'équilibre, le médicament est distribué de façon hétérogène à travers les tissus (Gunaratna, 2001). Le volume de distribution représente l'espace de dilution du médicament à l'état d'équilibre (LaMattina & Golan, 2008; Tozer & Rowland, 2006) et est calculé par la formule  $V_d = \text{quantité de médicament dans le corps} / \text{concentration plasmatique du médicament} = (F \times \text{dose}) / (\text{AUC}_{\text{inf}} \times k_e) = \text{Cl} / k_e$  (KuKanich, 2011; LaMattina & Golan, 2008; O'Donnell et al., 2012). Le volume de distribution est dit apparent, car il ne correspond pas à un volume physiologique (Gunaratna, 2001). Une valeur élevée de  $V_d$  indique que le médicament est fortement distribué à des sites extravasculaires (Gunaratna, 2001; O'Donnell et al., 2012). Le principe actif du médicament peut se trouver sous sa forme libre ou se lier aux protéines plasmatiques. Lors qu'il est lié aux

protéines, il est sous une forme inactive sous laquelle il ne peut généralement pas se rendre à l'organe cible (LaMattina & Golan, 2008). La vitesse de diffusion dépend donc de la proportion du médicament qui est lié aux protéines et également de la facilité dont le médicament se rend aux organes ciblés (LaMattina & Golan, 2008).

Lorsque nous regardons un graphique de la concentration plasmatique du médicament en fonction du temps, il est possible de calculer l'aire sous la courbe (AUC). L'aire sous la courbe nous permet de quantifier l'exposition de l'animal au médicament (KuKanich, 2011). L'AUC peut se calculer simplement en additionnant l'aire de tous les trapèzes qui forment la courbe (Tozer & Rowland, 2006). Puisque la courbe n'atteint jamais une concentration nulle, nous devons additionner l'aire de tous les trapèzes jusqu'à la dernière concentration plasmatique et additionner ce dernier résultat à la formule  $C_{pt}/k_e$  où  $C_{pt}$  est la dernière concentration plasmatique et  $k_e$  est la constante d'élimination (Shargel et al., 2005). L'aire sous la courbe peut ensuite être utilisée pour calculer la biodisponibilité, le volume de distribution et la clairance de notre molécule.

La clairance d'une molécule est le volume de sang (exposé à un organe) qui est dépourvu du médicament par unité de temps (KuKanich, 2011; LaMattina & Golan, 2008; O'Donnell et al., 2012; Tozer & Rowland, 2006). La clairance se calcule donc avec l'équation  $Cl = Q \times E$  où  $Q$  représente le débit sanguin et  $E$  le coefficient d'extraction de l'organe (Gunaratna, 2001; Tozer & Rowland, 2006). La clairance totale est la somme de tous les mécanismes de clairance, c'est-à-dire la clairance rénale, la clairance hépatique, la clairance intestinale et la clairance effectuée par d'autres organes (KuKanich, 2011; LaMattina & Golan, 2008).

Finalement, un autre paramètre pharmacocinétique très utile pour décider du mode d'administration des médicaments et des intervalles d'administration est le temps de demi-vie. Le temps de demi-vie d'élimination ( $T_{1/2}$ ) est le temps nécessaire pour que la concentration plasmatique diminue de moitié lorsque l'équilibre de distribution (pseudo-équilibre) est atteint (KuKanich, 2011; LaMattina & Golan, 2008). Dans un modèle idéal à un compartiment, nous pouvons estimer qu'après 10 fois le temps de demi-vie, la concentration plasmatique aura diminué de plus de 99,9 % (KuKanich, 2011). Le temps de demi-vie se calcule en fonction du volume de distribution et de la clairance (également en fonction de la constante d'élimination, puisque  $k_e = Cl/V$ ) par la formule  $T_{1/2} = (\ln [2] \times V_d)/Cl$  (LaMattina & Golan, 2008) donc,  $T_{1/2} = \ln (2)/k_e$  ou  $0,693/k_e$ . La constante de vitesse d'élimination ( $k_e$ ) est déterminée lorsque l'équilibre de distribution (pseudo-équilibre) est atteint (Tozer & Rowland, 2006). Tout ce qui peut affecter le volume de distribution tels l'âge, le sexe et les maladies et tout ce qui peut affecter la clairance, incluant les dysfonctions hépatiques ou rénales, peut affecter le temps de demi-vie (LaMattina & Golan, 2008).

Peu d'études ont été publiées sur la pharmacocinétique des médicaments anesthésiques chez les grenouilles. Une étude de Wayson et collaborateurs (1976) décrit des temps de demi-vie à différentes températures environnementales avec l'utilisation de 1 mg de tricaine méthanesulfonate intracoelomique chez des grenouilles *Rana pipiens*. Il est cependant difficile de comparer ces données puisque l'expérience a été effectuée chez une espèce de grenouille différente de la grenouille africaine à griffes. De plus, Wayson et collaborateurs (1976) utilisent des homogénats de grenouilles entières pour analyser les concentrations de MS-222 alors que le temps de demi-vie d'élimination se détermine à l'aide de mesures de concentrations plasmatiques (KuKanich, 2011; LaMattina & Golan, 2008).

La pharmacocinétique de l'eugénole et du propofol, administrés en bain d'immersion chez la grenouille africaine à griffes, a été réalisée dans le cadre de deux études (Guénette et al., 2007; Guénette et al., 2008). Guénette et collaborateurs (2008) ont étudié la pharmacocinétique d'un bain d'immersion de 15 minutes de 88 mg/L de propofol. Le propofol administré de cette façon offre une anesthésie légère de très courte durée. Pour réaliser la pharmacocinétique, des échantillons sanguins terminaux (3 grenouilles par point de référence) ont été prélevés aux temps 0 et 30 minutes ainsi que 1, 2, 4 et 6 heures et analysés en utilisant la chromatographie liquide à haute performance et la spectrométrie de masse en tandem (Guénette et al., 2008). Les résultats sont résumés dans le tableau I. De façon similaire, la pharmacocinétique d'un bain d'immersion d'eugénole de 350 mg/L de 15 minutes chez des grenouilles *X. laevis* a été réalisée (Guénette et al., 2007). Un bain d'eugénole de 15 minutes à cette concentration crée une anesthésie chirurgicale de 30 minutes. Des échantillons sanguins terminaux (3 grenouilles par point de référence) ont été prélevés à 0, 15 et 30 minutes ainsi qu'à 1, 2, 4, 6, 12 et 24 heures puis analysés en utilisant la chromatographie liquide à haute performance et la spectrométrie de masse en tandem (Guénette et al., 2007). Les résultats sont également résumés au tableau I.

Tableau I. Résumé des paramètres pharmacocinétiques du propofol et de l'eugénole administrés en bain d'immersion chez la grenouille africaine à griffes, *Xenopus laevis*.

Médicament anesthésique	T <sub>1/2</sub> terminale (heures)	C(max) (µg mL <sup>-1</sup> )	T(max) (minutes)	AUC <sub>0-t</sub> (µg mL <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	AUC (µg mL <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
Propofol (88 mg/L, 15 min)	1,18	12,1	0	24,07	24,71
Eugénole (350 mg/L, 15 min)	4	20,01	15	55,72	56,05

C'est donc grâce à tous ces paramètres pharmacocinétiques qu'il est possible de prédire le comportement du médicament administré. Il ne faut cependant pas oublier que ces paramètres sont influencés par plusieurs facteurs et qu'ils ne sont pas nécessairement similaires entre les différentes espèces animales.

## Chapitre 2: Objectifs et hypothèses

Suite à la revue de littérature, nous constatons donc qu'il existe peu de données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques sur l'utilisation du bain d'immersion de tricaine méthanesulfonate pour l'anesthésie et l'euthanasie des grenouilles africaines à griffes. De plus, la relation dose-concentration-effets chez les différentes espèces d'anoures peut être très différente avec l'utilisation d'un même médicament.

Lors de l'utilisation de l'anesthésie au bain d'immersion de tricaine méthanesulfonate, nos hypothèses sont que des bains à des concentrations de 1 ou 2 g/L de MS-222 avec une induction de 20 minutes seraient suffisants pour créer une anesthésie chirurgicale de durée adéquate pour la plupart des manipulations. Wright (2001) suggère, par expérience, des concentrations de MS-22 de 1 à 2 g/L pour l'anesthésie chirurgicale de la plupart des grenouilles. Un temps d'induction de moins de 30 minutes, comme conseillé par Downes (1995), serait probablement sécuritaire, quitte à augmenter de façon progressive le temps d'induction s'il n'y a pas la perte complète des réflexes de recouvrement et de retrait. En ce qui concerne l'euthanasie au bain d'immersion de MS-222, nous savons déjà que le bain d'immersion d'une heure de MS-222 à une concentration de 3 g/L produit l'euthanasie en 5 h (Torreilles et al., 2009). Nous croyons que même si le cœur bat durant 5 heures pendant la surdose de MS-222, le SNC perd son activité bien avant ce dernier.

Plus spécifiquement, nos objectifs sont :

- 1) Déterminer la pharmacocinétique, la pharmacodynamique et la toxicité de l'anesthésie au bain d'immersion de MS-222 après une administration unique de 20 minutes d'une

dose courante (1 et 2 g/L) chez les grenouilles *X.laevis*. Démontrer les changements physiologiques pendant l'anesthésie (fréquences cardiaque et respiratoire, saturation en oxygène, réflexe de retrait, test à l'acide acétique, réflexe de recouvrement).

- 2) Déterminer les changements physiologiques à la suite d'une administration unique de MS-222 à une concentration de 3 g/L permettant l'euthanasie (EEG, saturation en oxygène, fréquence cardiaque). Déterminer si l'activité cardiaque permet une bonne perfusion de la grenouille. Évaluer l'activité du système nerveux central afin de voir comment elle est corrélée avec les changements physiologiques.
- 3) Vérifier si le pentobarbital sodique pourrait être injecté en supplément lors de la surdose de tricaine méthanesulfonate afin d'avoir une euthanasie plus rapide.



## **Chapitre 3 : Articles**

### *1. Premier article*

#### **Pharmacologic Parameters of MS-222 and Physiologic Changes in Frogs (*Xenopus laevis*) After Immersion at Anesthetic Doses**

Vanessa Lalonde-Robert, Francis Beaudry and Pascal Vachon

Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Biomedicine, Saint-Hyacinthe, Qc,  
Canada

Published in the Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 2012  
volume 51(4), 464-468.

## 1.1 Abstract

We evaluated the anesthetic efficacy of MS222 (dose, 1 or 2 g/L; pH 7) administered as an immersion bath (duration, 20 min) for nonbreeding female *Xenopus leavis* frogs ( $n = 33$ ; average body weight,  $103 \pm 16$  g). The acid acetic test, the withdrawal reflex, righting behavior, heart rate, respiratory frequency, and blood oxygen saturation were used to evaluate the level of anesthesia. Acetic acid and withdrawal reflex responses were present at 30 and 60 min following immersion for the 1 and 2 g/L doses, respectively. MS222 had no effect on heart rate or oxygen saturation, but caused pronounced respiratory depression, as expected. Microscopic observations of selected tissues (heart, lung, liver, kidneys, and skin) showed no evidence of lesions at 24 h after immersion. In addition, we calculated the pharmacokinetics of MS222 in plasma and analyzed the drug by HPLC–tandem mass spectrometry. The calculated half-life of MS222 is 3.2 h. We conclude that MS222 administered at 1 or 2 g/mL via immersion bath for 20 min is an effective anesthetic that can be used for surgical procedures of less than 30 or 60 min, respectively, in *Xenopus leavis*.

## 1.2 Introduction

African clawed frogs (*Xenopus leavis*) have been used extensively in research because their eggs can be collected either naturally or surgically after hormonal stimulation.<sup>13</sup> Tricaine methanesulfonate, commonly known as MS222, is the primary agent used to induce anesthesia for surgical interventions in amphibians.<sup>3,26,27</sup> MS222 acts similarly to other local anesthetics (such as lidocaine and benzocaine) by blocking sodium currents,<sup>4</sup> and has widely been used as a general anesthetic in fish and amphibians. Other drugs that have been used as anesthetics in

amphibians include systemic injections of ketamine or tiletamine combined with zolazepam,<sup>12</sup> benzocaine,<sup>2,21,25</sup> barbiturates,<sup>7,27</sup> methoxyflurane and isoflurane administered topically or via a water bath,<sup>17,18,23,26</sup> intraceolomic or intravenous injections or bath immersion of propofol,<sup>8,11,22</sup> and bath immersion in a eugenol-containing solution.<sup>6,9</sup> Most of these anesthetics produce variability in depth and duration of anesthesia, with differences seen both within and between species, between sexes, and with animal weight and route of administration.<sup>11</sup> MS222 appears to be one of the most reliable anesthetics for amphibians, but little is known about physiologic changes during MS222 anesthesia in *Xenopus laevis*, and no data are available regarding the plasma pharmacokinetics of this drug in frogs.

The primary goal of the present study was to determine the anesthetic effects of MS222 administered in a bath solution, as well as the pharmacokinetics of this drug in *Xenopus laevis* frogs when administered for 20 min at anesthetic doses of 1 and 2 g/L.

### 1.3 Materials and methods

Animals and husbandry. Nonbreeding female frogs ( $n = 33$ ; body weight [mean  $\pm$  1 SD],  $103 \pm 16$  g; *Xenopus laevis*; Xenopus I, Dexter, MI) were used: 12 frogs ( $n = 6$  per MS222 concentration) for the evaluation of physiologic and histopathologic changes associated with MS222, and 21 frogs ( $n = 3$  per time point) for the pharmacokinetic study. Frogs were housed in salted (final concentration, 0,5 g/L; Instant Ocean Synthetic Salts, Aquarium Systems, Mentor, OH) water-filled (more than 4 L per frog) polycarbonate cages (40 cm  $\times$  20 cm  $\times$  15 cm; Ancare, Bellmore, NY). The purified water was obtained by processing municipal tap water by filtering (0,5  $\mu$ m filter) and processing it by reverse osmosis

and then passing it through activated charcoal, UV treatment (S12Q, Gold Sterilight UV Water Sterilizer, Guelph, Canada). Water quality parameters were pH 6,8 to 7,3, less than 0,1 ppm chlorine and chloramines, less than 0,2 mg/mL ammonia (normal range, 0,4 to 0,6 mg/mL), no nitrites (normal, less than 1 mg/mL), no hardness (normal, 70 to 150 mg/mL), no copper (all PVC tubing) or other heavy metals (iron, manganese), and a conductivity of 10 M $\Omega$ . Water and room temperatures were kept at  $21 \pm 1$  °C at all times. Water was changed and the containers were cleaned twice weekly. Frogs were fed every other day with commercial chow (Xenopus Express, Brooksville, FL). The experimental protocol was approved by the IACUC of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal prior to animal use and is in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.<sup>1</sup>

MS222 administration. For the immersion bath, recommended MS222 concentrations of 1 and 2 g/L were used.<sup>3</sup> MS222 was added to purified water, and the solution was buffered to a pH of  $7,0 \pm 0,4$  with sodium bicarbonate (Sigma Aldrich, St Louis, MO) and kept at room temperature. Approximately 250 mL of this preparation was then put in a metal container (diameter, 15 cm; depth, 10 cm), and frogs were placed in this solution for 20 min, which is less than the maximal recommended induction time (30 min).<sup>3</sup> The container was covered so that the frogs were in full darkness for the induction period. After the immersion bath, frogs were rinsed thoroughly with purified water and placed into polycarbonate cages with purified water at the bottom, such that their nostrils were in contact with air. Frogs were rinsed regularly to keep their skin moist.

Pharmacodynamic study. For the evaluation of anesthetic depth, 5 different tests were used: the acetic acid test, the righting reflex, withdrawal reflex, heart rate, and oxygen saturation. Frogs were tested prior to the bath immersion (-15 min) and until recovery of

baseline values and observations (that is, at 0 [immediately after the immersion bath], 15, and 30 min and at 1 and 2 h after bath immersion). The experimenter was present throughout the pharmacodynamic study.

Unrestrained frogs were assessed first with the acetic acid test, which is an indicator of depth of analgesia.<sup>19</sup> This test consists in the application of single drops of incrementally increasing concentrations of acetic acid to the dorsum of the frog's thigh or leg. Volume was controlled by using an automatic pipette that delivered 20  $\mu$ L. We used 5 concentrations of acetic acid (0%, 5%, 10%, 20%, and 50%) to test the frogs' pain sensitivity. A contact time of 1 to 2 s was allowed before we thoroughly rinsed the tested skin area with purified water. The test was considered positive when the frog exhibited the wiping response, which is a motor reflex where the frog dislodges the drop by using its other leg. If no reaction was observed, the next higher concentration of acetic acid was applied alternating between right and left legs and thighs. The test was considered positive when the frog reacted to 5% acetic acid or higher.

Righting and withdrawal reflexes then were evaluated. The withdrawal reflex was tested by pinching one phalangeal articulation of the pelvic limb with surgical forceps for a maximum of 2 s. The righting reflex was evaluated as the frog's ability to turn on its ventrum when placed on its back.

Last, heart rate and oxygen saturation were measured by using a pulse oximeter (CANL-425V, Med Associates, St Alban, VT). To minimize variability in the readings when frogs were not anesthetized, a handler applied a 2 hand restraint and the reading recorded after the value on the pulse oximeter remained constant for at least 3 s. For the cardiovascular

parameters, frogs were placed in a sternal position, and the probe was placed under the sternum.

For the evaluation of surgical anesthesia, small (0,4 cm) incisions were made through the abdominal skin and muscles (without entering the abdomen) at the 15 and 30 min and 1 and 2 h time points after the acetic acid test, righting reflex, withdrawal reflex, heart rate and oxygen saturation had been assessed. No sutures were applied. Any movement from the frog was considered as a sign of insufficient surgical anesthesia.

Pharmacokinetic study. Frogs were placed individually in an immersion bath containing MS222 at 2 g/L. Terminal intracardiac blood samples (0,3 mL) were collected in heparin tubes at 15 and 30 min and at 1, 2, 4, 6, and 12 h after immersion. The experimenter was present throughout the pharmacokinetic study.

When frogs were anesthetized insufficiently for intracardiac blood sampling, a rapid anesthesia with eugenol (concentration, 350 mg/L; immersion for 15 min prior to the blood collection time point) was performed.<sup>9</sup> This intervention likely had no effect on the plasma concentration of MS222 as measured by HPLC–tandem mass spectrometry. Briefly, the HPLC system was a Perkin–Elmer liquid chromatography apparatus (Series 200, Boston, MA), and spectrometry system used was an API 2000 QTRAP (AB-Sciex, Concord, Canada). Data acquisition and analyses were performed by using Analyst 1.4 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Concord, Canada). Calibration curves were calculated by using the equation  $y = ax + b$ , as determined by weighted (1/x) linear regression of the calibration line constructed from the peak-area ratios of the drug and the internal standard. MS222 was extracted from frog plasma by using a protein precipitation method (50  $\mu$ L plasma was mixed with 500  $\mu$ L of

internal standard solution (1 µg/mL phenylephrine in acetonitrile in a 1,5 mL centrifuge tube). Samples were vortexed vigorously and allowed to rest 10 min at room temperature prior to centrifugation. Samples were centrifuged at approximately  $12000 \times g$  for 10 min, and 300 µL of the supernatant was transferred into a 400 µL injection vial. Chromatographic separation was performed by using an isocratic mobile phase with a Thermo Aquasil C18  $100 \times 2,1$  mm (3 µm) column (Thermo Scientific, Waltham, MA). The mobile phase consisted of acetonitrile, water, and formic acid at a ratio of 80:20:0,4, respectively. The flow rate was fixed at 250 µL/min. Five microliters of the extracted sample was injected, and the total run time was set to 3,5 min. The mass spectrometer was interfaced with the HPLC system by using a pneumaticassisted electrospray ion source. The N2 settings for ion source gas 1 was set to 20 units, ion source gas 2 was set to 50 units, the temperature was set to 400 °C, and the ESI electrode was set to 5000 V. The declustering potential was set at 50 V, the entrance potential was set to 10 V, and the collision energy was set to 30 V. The collision gas used was nitrogen (set to medium). Selected reaction monitoring transitions were  $m/z$  166 → 138 and 168 → 91 for MS222 and phenylephrine respectively. The dwell time was set at 100 ms and the pause time at 5 ms.

The observed coefficient of determination was greater than or equal to 0.9922. The coefficient of variation (an indicator of precision) ranged from 0.3% to 5.2%, and the accuracy observed was 95.3% to 113.9%. The analytical ranges used were from 0.1 to 50 µg/mL.

Histology. Frogs used in the pharmacodynamic study were euthanized at 24 h after the experiment, and selected tissues (heart, lungs, kidneys, liver, and skin) were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Sections (thickness, 5 µm) were stained with hematoxylin–eosin–safran and evaluated by microscopy.

Statistical analysis. Statistical analysis of heart rate, respiratory frequency, and oxygen saturation was performed by using SAS (version 9.2, SAS Institute, Cary, NC) according to the repeated measures linear model, with time as a within-subject factor. Statistical significance was set at a *P* value of less than 0.05.

Pharmacokinetic parameters of MS222 in plasma were calculated by using noncompartmental methods.<sup>14</sup> The area under the curve from time 0 to the last measurable concentration ( $AUC_{0-t}$ ) was calculated by using the linear trapezoidal rule. A terminal rate constant of elimination was calculated by using a minimum of 3 measurable plasma concentrations, and the terminal elimination half-life was calculated as  $0.693 \div k_{el}$ , where  $k_{el}$  is the elimination constant. The AUC extrapolated to infinity ( $AUC_{inf}$ ) was calculated by using  $AUC_{0-t} + C_{last}/k_{el}$ , where  $C_{last}$  is the last measurable plasma concentration.

#### 1.4 Results

Pharmacodynamic study. For the acetic acid test at baseline, all frogs in both the 1 and 2 g/L groups reacted at the 5% acetic acid concentration. After immersion in MS222 at 1 g/L, all frogs lost the withdrawal reflex and response to acetic acid completely; the reflexes returned at  $52 \pm 13$  min and 30 min for the 1 and 2 g/L groups, respectively. The righting reflex returned by  $58 \pm 4$  min, and spontaneous movements were observed at  $40 \pm 14$  min. For the evaluation of surgical anesthesia, no reactions (spontaneous movements) occurred before 30 min.

After immersion in the 2 g/L immersion bath, frogs lost the withdrawal reflex completely; it returned at  $80 \pm 23$  min. The acetic acid response first occurred in 33 and 66%



of the animals at 60 and 120 min. The righting reflex was seen at  $118 \pm 25$  min, and all frogs showed spontaneous movements at  $83 \pm 19$  min. For the evaluation of surgical anesthesia, 40% of frogs first reacted at 60 min and the rest at 120 min.

Heart rate, respiratory frequency, and oxygen saturation after immersion in MS222 are presented in Figures 1 through 3, respectively. For the 1 g/L MS222 immersion, postexposure values were significantly ( $P < 0.01$ ) different from baseline values, but no significant effects between the 2 g/L postexposure results, suggesting that the stress of restraint may have increased heart rate at baseline. MS222 induced significant ( $P < 0.0001$ ) respiratory depression immediately after MS222 exposure that returned very rapidly to baseline values within 15 min after exposure; no significant changes were noted for oxygen saturation.

For the 2 g/L MS222 immersion, no significant changes were noted in heart rate and oxygen saturation. The variability in the baseline heart rate variability is important and suggests that restraint-associated stress may be a contributing factor; however, no decrease of heart rate after anesthesia was seen. Significant ( $P < 0.001$ ) respiratory depression was present immediately and at 15 min after MS222 exposure but had started to return to baseline by 30 min after exposure. Even though respiratory depression occurred at both MS222 concentrations, oxygen saturation stayed within normal limits, suggesting that greater oxygen exchange may occur through the skin than the lungs.

Pharmacokinetic study. The pharmacokinetics of plasma concentrations of MS222 in frogs after a 2 g/L immersion bath were a maximal blood concentration of  $38,7 \mu\text{g/mL}$  at 15 min, with an  $\text{AUC}_{\text{last}}$  of  $58,9 \mu\text{g/h/mL}$  and an  $\text{AUC}_{\text{inf}}$  of  $62.5 \mu\text{g/h/mL}$  (Figure 4). The calculated elimination half-life is 3,2 h.

Histology. Microscopic observations revealed a normal appearance of all tissues when compared with normal histology,<sup>25</sup> independent of the MS222 dose exposure. This is a common finding in many studies using MS222.

## 1.5 Discussion

MS222 produces an effective level of anesthesia in *Xenopus laevis* frogs when administered via bath immersion for 20 min at a concentration of 1 or 2 g/L. The surgical anesthetic evaluation and the acetic acid test both revealed that anesthesia duration is less than 30 and 60 min with 1 and 2 g/L MS222, respectively. For 2 g/L MS222, although the withdrawal reflex appeared in all frogs approximately 20 min later than did the acetic acid test response, the acetic acid response was present in only 33% of frogs at 30 min; therefore the acetic acid test and withdrawal reflex should be used concurrently to evaluate anesthesia depth after the immersion of frogs in MS222. This finding suggests that MS222 may provide some skin analgesia at increased concentrations. We previously showed that with the use of eugenol, the acetic acid test always occurred earlier than the withdrawal reflex, suggesting that the withdrawal reflex is the best indicator of anesthesia depth,<sup>6,9</sup> a result that was not seen in the current study. The righting reflex and spontaneous movements appeared approximately at the same time as did the withdrawal reflex for the 1 g/L MS222 concentration and later than did the withdrawal reflex for the 2 g/L MS222 concentration. In light of our combined results, we conclude that immersion of frogs in a bath of 1 or 2 g/L MS222 for 20 min is appropriate for surgical procedures lasting less than 30 or 60 min, respectively, and that 2 g/L is the better option. Our findings are in accordance with actual anesthesia practices in most research

facilities working with *Xenopus leavis*.<sup>26,27</sup> However, we only evaluated the frogs at 15 and 30 min; more frequent checks during the first 30 likely would be useful for effectively monitoring the frogs.

Because MS222 primarily blocks sodium conductance<sup>4</sup> and can induce both sensory desensitization and motor blockade at high doses,<sup>15</sup> the use of this drug might be questionable, because a paretic or paralytic effect is possible. That is, MS222 could inhibit the sensory and motor functions of the peripheral nervous system without having an effect on the CNS. Regardless, MS222 remains a viable choice for general anesthesia, because all sensory input to the brain is lost; however because of the lack of loss of consciousness (a usual criterion for general anesthesia), subsequent events might be stressful for the frog. We know little about the blood–brain barrier in frogs, and if MS222 does cross into the brain, it likely acts as a central depressant. This hypothesis needs to be verified before any conclusion can be made regarding the central anesthetic effects of MS222 in frogs.

Heart rate and blood oxygen saturation were relatively unaffected by anesthesia with MS222. However, the respiratory rate was depressed severely after bath immersion, and the duration of this response is not an indicator of surgical anesthesia. For 1 g/L MS222, mean heart rate differed significantly between baseline and after exposure. This difference may be explained by handling-associated stress before anesthesia, given that the frogs in the 1 g/L group struggled considerably while baseline values were being obtained. Under stressful conditions, hyperglycemia and tachycardia have been reported in frogs even during anesthesia with MS222.<sup>10,16</sup> In the context of its cardiorespiratory effects, MS222 is a good anesthetic for frogs, because oxygen saturation was well conserved throughout anesthesia. We obtained similar cardiorespiratory findings when we compared the present results with our previous

findings from eugenol bath immersion of frogs similar in body weight to the current animals.<sup>9</sup> This result suggests that although *Xenopus* frogs are mouth breathers and although oxygen exchange through the skin has been considered less important in this species, the blood flow in the skin may increase to maintain oxygen saturation. This compensation could easily be verified by using a laser flow meter to measure capillary blood flow during anesthesia. However, different results are obtained in *Rana catesbiana*, in which MS222 causes severe apnea, thereby inducing a state of acidosis and hypoxia.<sup>5,20</sup> However, these previous experiments were performed in unbuffered solutions, and the acidity of the solution likely induced the acidosis and hypoxia in the frogs.<sup>3</sup> Although MS222 is still reported to cause hypoxia<sup>3</sup>, this effect may be due to the preparation of the solution or to differences across species.

Amphibians require much higher concentrations of MS222 than do mammals;<sup>3</sup> the low plasma availability (AUC) of MS222 in frogs may explain this difference. Although the half-lives of MS22 (3,2 h) and eugenol (4 h) are similar, the elimination and availability of these 2 drugs differ somewhat. The elimination of MS222 dips markedly between 2 and 4 h, suggesting either slow hepatic metabolism or redistribution of the drug, possibly from fat tissue given that the drug is highly lipophilic.<sup>9</sup> Even though MS222 is readily soluble in water, it is highly lipophilic and nonionized in plasma, making MS222 a drug that will distribute well in living organisms.<sup>3</sup> The metabolism of MS222 is temperature-dependent, and in vitro studies with liver homogenate show very slow metabolism of MS222 in frogs.<sup>24</sup> However, our current study revealed that MS222 has a relatively short half-life and low drug availability (according to the AUC) in frogs—findings that suggest that this drug is nontoxic after repeated administration. However, the marked relaxant effect of MS222 on heart muscle is a possible

reason for the reported muscle toxicity in poikilotherms.<sup>23</sup> At doses of 1 and 2 g/L, we did not see any effect of MS222 on heart rate, cardiac ECG tracings (not shown), or cardiac histology, thus suggesting that no significant heart toxicity occurred.

In conclusion, one-time immersion of African clawed frogs in MS222 at 1 or 2 g/L is effective and does not appear to induce toxicity. This treatment had no effect on heart rate or oxygen saturation, and all frogs recovered without any apparent side effects. The pharmacokinetics of MS222 do not suggest that daily administration at an anesthetic dose would be detrimental to the frogs, given that its half-life of 3,2 h supports a lack of drug accumulation with repeated administrations. Both MS222 and eugenol<sup>6,9</sup> showed similar results, and we therefore recommend MS222 as an anesthetic for *Xenopus leavis*.

## 1.6 Acknowledgements

We thank Guy Beauchamp (research assistant; Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal) for the statistical analyses and Pierre Hélie DMV, DACVP (Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal) for histologic observations. We also thank Marie-Thérèse Parent for preparing the figures.

## 1.7 References

1. Canadian Council on Animal Care. 1993. Guide to the care and use of experimental animals, vol 1, 2nd ed. Ottawa (Canada): Canadian Council on Animal Care.

2. Cecala KK, Steven JP, Dorcas ME. 2007. A comparison of the effectiveness of recommended doses of MS222 (tricaine methanesulfonate) and Orajel (benzocaine) for amphibian anesthesia. *Herpetol Rev* 38:63–66.
3. Downes U. 1995. Tricaine methanesulfonate in amphibians: a review. *Bull Assoc Rept Amph Vet* 5:11–16.
4. Frazier DT, Narahashi T. 1975. Tricaine (MS222): effects on ionic conductances of squid axon membranes. *Eur J Pharmacol* 33:313–317.
5. Gottlieb G, Jackson DC. 1976. Importance of pulmonary ventilation in respiratory control in the bullfrog. *Am J Physiol* 230:608–613.
6. Goulet F, Hélie P, Vachon P. 2010. Eugenol anesthesia of *Xenopus laevis* frogs of different body weight. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 49:460–463.
7. Green CJ. 1979. Classes amphibia, reptilian, and aves, p 111–113. In: Green CJ, editor. *Animal anaesthesia: laboratory animal handbook* 8. London (UK): Laboratory Animals.
8. Guénette SA, Beaudry F, Vachon P. 2008. Anesthetic properties of propofol in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 47:35–38.
9. Guénette SA, Hélie P, Beaudry F, Vachon P. 2007. Eugenol for anesthesia of *Xenopus laevis* frogs. *Vet Anaesth Analg* 34:164–170.
10. Harri MN. 1981. Hyperglycemia and hyperlactacidemia as stress indicators in the frog (*Rana temporaria*). *Comp Biochem Physiol C* 69:371–374.
11. Lafortune M, Mitchell MA, Smith JA. 2001. Evaluation of medetomidine, clove oil, and propofol for anaesthesia of leopard frogs, *Rana pipiens*. *J Herpet Med Surg* 11:13–18.
12. Letcher J, Durante R. 1995. Evaluation of use of tiletamine–zolazepam for anesthesia of bullfrogs and leopard frogs. *J Am Vet Med Ass* 207:80–82.

13. O'Rourke DP, Schultz TW. 2002. Biology and diseases of amphibians, p 793–826. In: Fox JG, Anderson LC, Franklin ML, Quimby FW, editors. Laboratory animal medicine, 2nd ed. San Diego (CA): Academic Press.
14. Rowland M, Towzer TN. 1995. Clinical pharmacokinetics: concepts and application, p 367–389. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Wilkins.
15. Selden S. 1989. Local anesthesia drugs and techniques, p 15–28. In: Muir WW, Hubbell JAE, editors. Handbook of veterinary anesthesia. St Louis (MO): CV Mosby.
16. Smith DG. 1974. Sympathetic cardiac stimulation in *Bufo marinus* under MS222 anesthesia. Am J Physiol 226:367–370.
17. Smith JM, Stump KC. 2000. Isoflurane anaesthesia in the African clawed frog (*Xenopus leavis*). Contemp Top Lab Anim Sci 39:39–42.
18. Stetter MD, Raphael B, Indiviglio F, Ross R. 1996. Isoflurane anesthesia in amphibians: comparison of five application methods, p 255–257. In: Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians. Yulee (FL): American Association of Zoo Veterinarians.
19. Stevens CW. 1992. Alternative to the use of mammals for pain research. Life Sci 50:901–912.
20. Tazawa H, Mochizuki M, Piper J. 1979. Respiratory gas transport by the incompletely separated double circulation in the bullfrog, *Rana catesbiana*. Respir Physiol 36:77–95.
21. Venable JJ. 1985. Benzocaine: an excellent amphibian anesthetic. Axolotol Newslett 14:19–21.
22. Von Esse FV, Wright KM. 1974. Effect of intracoelomic propofol in White's tree frogs, *Pelodytes caerulea*. Bull Assoc Reptil Amphib Vet 9:7–8.

23. Wass JA, Kaplan HM. 1974. Methoxyflurane anaesthesia for *Rana pipiens*. *Lab Anim Sci* 24:669–671.
24. Wayson KA, Downes H, Lynn RK, Gerber N. 1976. Studies of the comparative pharmacology and selective toxicity of tricaine methanesulfonate; metabolism as a basis of selective toxicity in poikilotherms. *J Pharmacol Exp Ther* 178:695–708.
25. Wiechmann AF, Wirsig-Wiechmann CR. 2003. *Atlas of Xenopus laevis histology*. Norwell (MA): Kluwer Academic Publishers.
26. Wright KM. 1996. Amphibian husbandry and medicine, p 436–458. In: Mader DR, editor. *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia (PA): W B Saunders.
27. Wright KM. 2001. Restraint techniques and euthanasia, p 111–122. In: Wright KM, Whitaker BR, editors. *Amphibian medicine and captive husbandry*. Malabar (FL): Krieger Publishing



1.8 Legend to figures

Figure 1. Heart rate (bpm; mean  $\pm$  1 SD) of *Xenopus laevis* frogs ( $n = 6/\text{dose}$ ) after their immersion for 20 min in a solution of MS222 at either 1 or 2 g/L. The -30 min and 0 min time points respectively represent control values prior to and immediately after immersion.

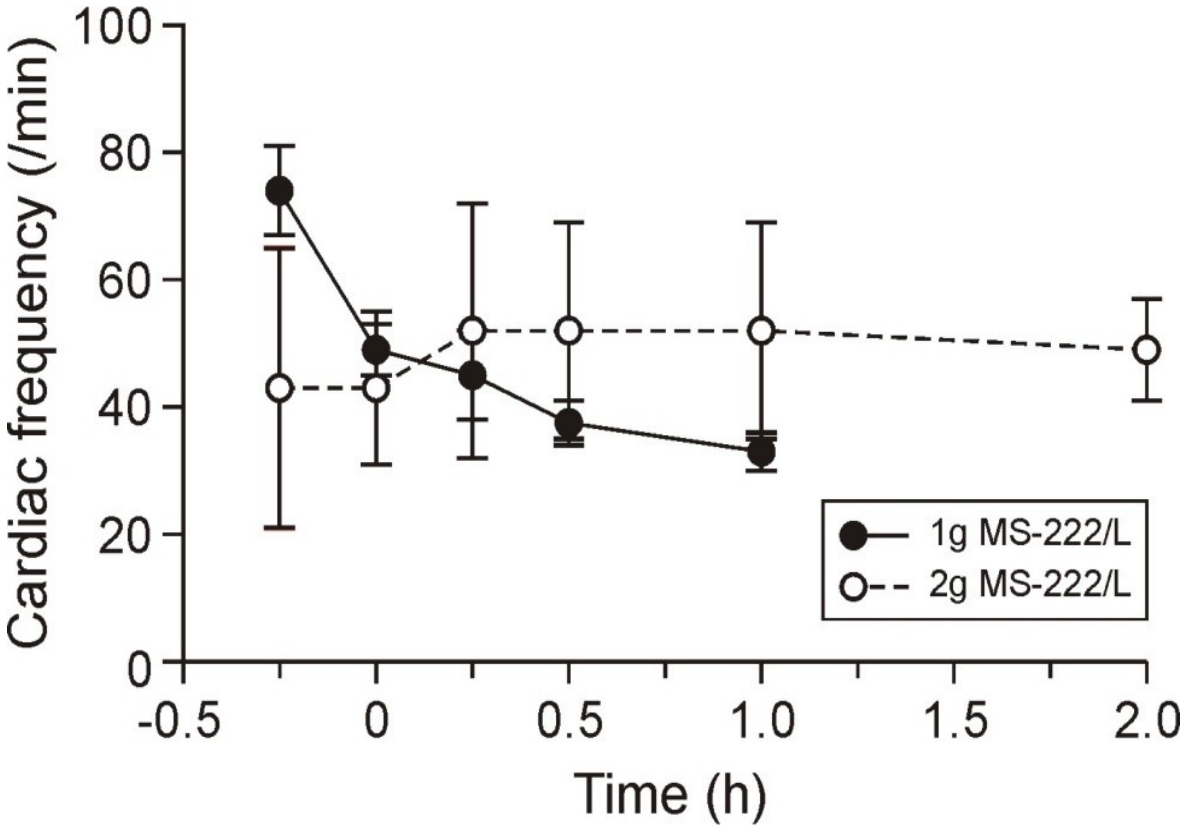


Figure 2. Respiratory frequency (breaths per minute; mean  $\pm$  1 SD) of *Xenopus laevis* frogs ( $n = 6$  per dose) after their immersion for 20 min in a solution of MS222 at either 1 or 2 g/L. The -30 min and 0 min time points respectively represent control values prior to and immediately after immersion.

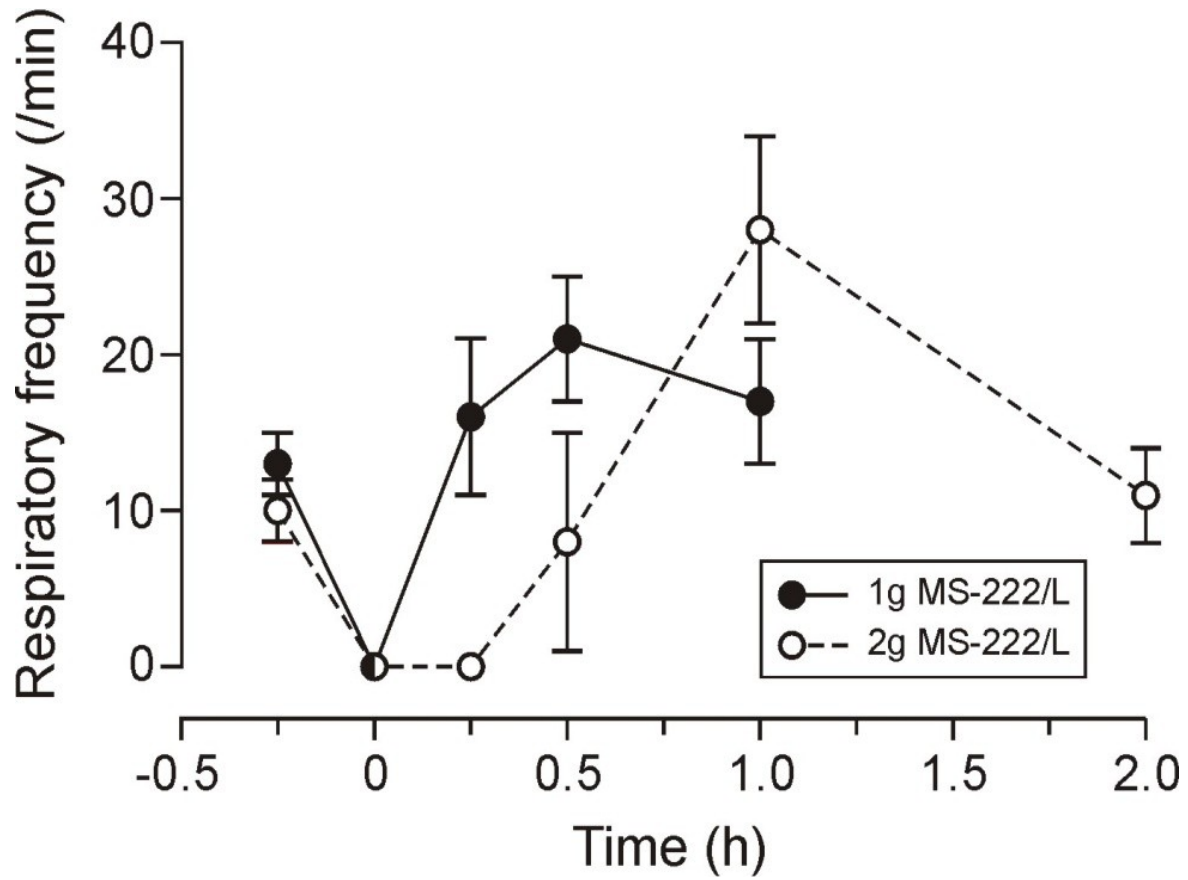


Figure 3. Oxygen saturation (%; mean  $\pm$  1 SD) of *Xenopus laevis* frogs ( $n = 6/\text{dose}$ ) after their immersion for 20 min in a solution of MS222 at either 1 or 2 g/L. The -30 min and 0 min time points respectively represent control values prior to and immediately after immersion.

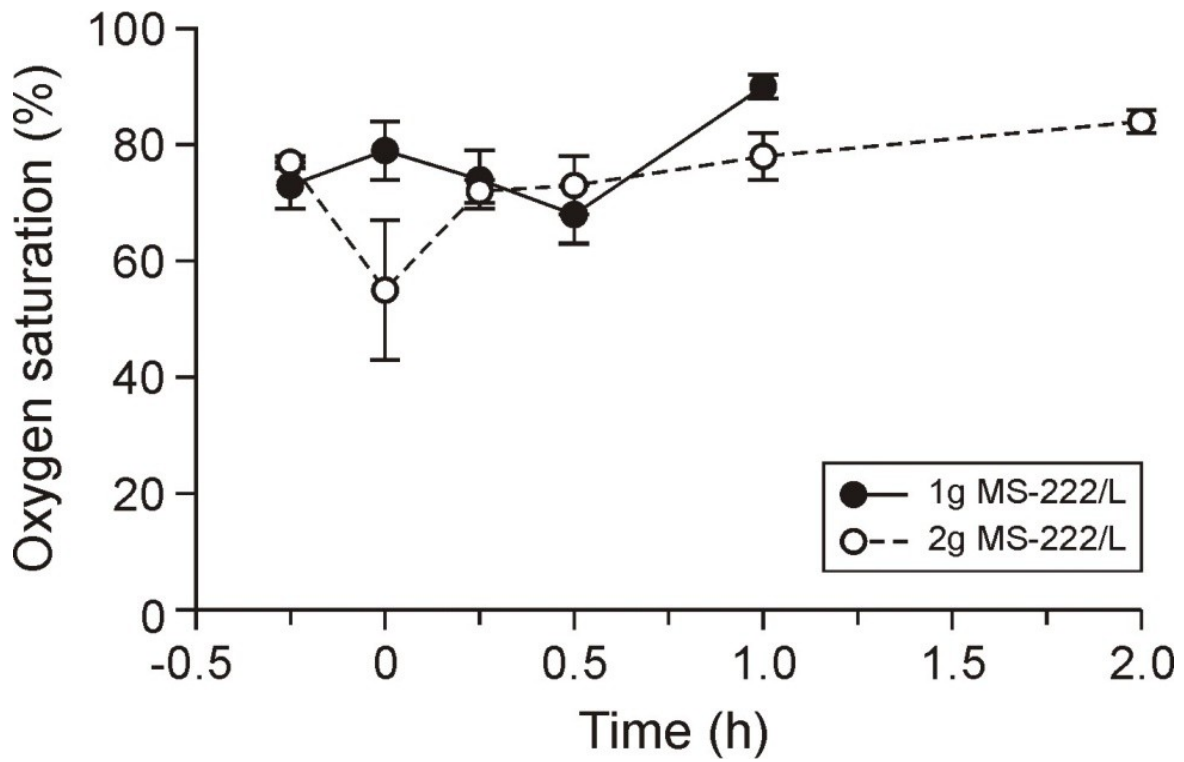
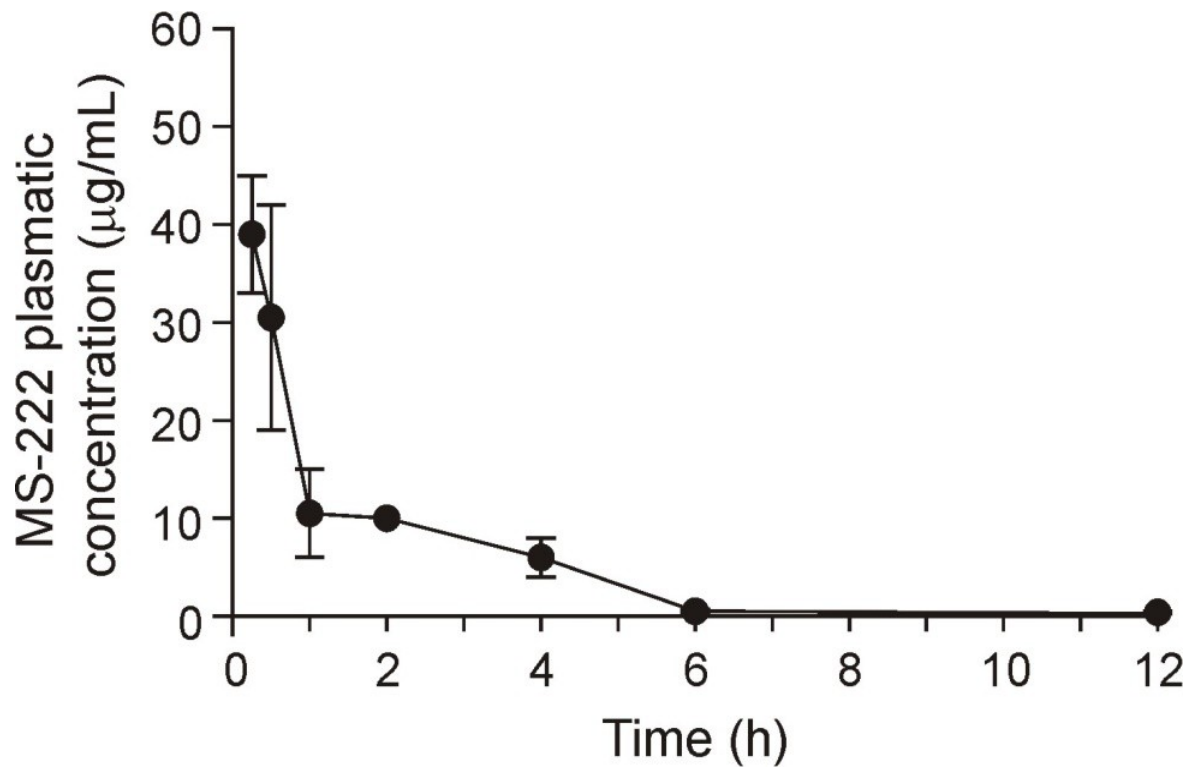


Figure 4. Plasma concentration (mean  $\pm$  1 SD) after the immersion of *Xenopus laevis* frogs ( $n = 6/\text{dose}$ ) for 20 min in a solution of MS222 at either 1 or 2 g/L. The -30 min and 0 min time points respectively represent control values prior to and immediately after immersion.



2. *Deuxième article*

**Electroencephalographic and Physiologic Changes after Tricaine Methanesulfonate Immersion of African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*)**

Vanessa Lalonde-Robert<sup>1</sup>, Sébastien Desgent<sup>2</sup>, Sandra Duss<sup>2</sup> and Pascal Vachon<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Veterinary Biomedicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe Quebec, Canada

<sup>2</sup> Department of Physiology, Ste-Justine Hospital Research Center, University of Montreal, Montréal, Québec, Canada

Published in the Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 2012 volume 51(5), 622-627.

## 2.1 Abstract

The objective of this study was to determine electroencephalographic and complementary physiologic changes in *Xenopus laevis* frogs after bath immersion in MS222. We also evaluated the addition of sodium pentobarbital injected intracoelomically 2 h after MS222 immersion to achieve euthanasia. Frogs ( $n = 9$ ) weighing  $105,5 \pm 8,4$  g (mean  $\pm$  1 SD) were immersed in MS222 at either 1 or 3 g/L until anesthesia was achieved; a conductive stainless steel screw then was implanted in the skull on top of the outer pial surface of the brain. Frogs were immersed again in MS222 at the same concentration as previously, and electroencephalograms, heart rate, oxygen saturation, and respiratory movements were recorded. Amplitude and mean frequency of the electroencephalographic signal were evaluated at 15 min intervals until a flat-line signal was achieved. At 2 h after induction, frogs were injected intracoelomically with sodium pentobarbital (0,5 mL; 240 mg/mL) to accelerate euthanasia. Immersion of frogs in 1 or 3 g/L of MS222 depressed cerebral activity within 30 min without a significant effect on cardiac function. Intracoelomic injection of sodium pentobarbital at 2 h after MS222 administration rapidly ( $3,2 \pm 1,7$  min) induced cardiac arrest. In conclusion, immersion in MS222 can be used for the collection of organs from *X. laevis* frogs, but the addition of pentobarbital is required to achieve euthanasia.

## 2.2 Introduction

*Xenopus laevis* frogs have been one of the most popular aquatic research models for developmental studies<sup>17</sup> and genetic research.<sup>4</sup> Despite the wide use of these animals, few studies have evaluated euthanasia methods in this species. Euthanasia, as defined by the

AVMA guidelines, is an irreversible process by which death is given in a humane and ethical way to cause a rapid loss of consciousness, no distress, respiratory or cardiac arrest, and loss of brain function.<sup>2</sup> Cardiac arrest is a well-accepted euthanasia criterion for mammals. However, in amphibians, cardiac function can persist for very long periods of time (that is, 3 to 5 h) after administration of chemical euthanasia agents.<sup>13</sup> No information is available on the effects of anesthesia and euthanasia methods on brain activity in frogs.

Overdose of tricaine methanesulfonate (MS222), administered via bath immersion, is an accepted and commonly used method of euthanasia for frogs.<sup>2,13,25</sup> However, with MS222 concentrations of 3 or 5 g/L and an immersion time of 1 h, complete cardiac arrest may not occur until 3 to 5 h after administration.<sup>23</sup> Other common methods such as intracoelomic injection of sodium pentobarbital and sodium phenytoin or ventral application of 20% benzocaine gel also require 3 h or more for the cessation of heart function.<sup>23</sup>

Both pentobarbital and sodium phenytoin are antiepileptic drugs that depress the CNS either by opening GABAergic receptors (negatively charged chlorine ions entering the cell) or by blockade of sodium voltage-gated channels.<sup>1</sup> However, benzocaine is a local analgesic that acts on sodium voltage-gated channels in the peripheral nervous system, and because MS222 is in the same family of drugs, similar effects are expected.<sup>21</sup> MS222 is a widely used anesthetic in fish and amphibians, but its utility as a euthanasia agent is not well established.

The main goal of the current study was to determine electroencephalographic, cardiovascular, and respiratory changes during the euthanasia of *X. leavis* frogs by overdose of MS222 administered via an immersion bath. Our main hypothesis was that brain activity is depressed significantly after the administration of MS222, justifying its use for euthanasia as

well as anesthesia in this species. Because the time to achieve euthanasia is extremely long when MS222 is used as a sole agent,<sup>23</sup> a second objective was to evaluate whether intracoelomic injection of sodium pentobarbital hastened the onset of MS222-induced cardiac arrest.

### 2.3 Materials and Methods

Animals, housing, and husbandry. A total of 9 nonbreeding female *X. laevis* frogs (*Xenopus* I, Dexter, MI) weighing  $105,5 \pm 8,4$  g (mean  $\pm$  1 SD) were used. Frogs were housed in a modular recirculating system (XenoPlus Housing System, Techniplast, Philadelphia, PA) filled with water purified by reversed osmosis. The system renews 10% of its circulating water daily, and salts (Instant Ocean synthetic salts, Aquarium Systems, Mentor, OH) are added automatically to maintain appropriate pH (pH,  $7,0 \pm 0,5$ ) and conductivity ( $1800 \pm 100$   $\mu$ S). The ammonia concentration was tested weekly to verify 0 ppm. Room and water temperatures were kept at 18 °C, with a 12:12-h light:dark cycle. Each 27 L tank contained 3 to 5 frogs, which were fed a commercial pelleted diet (*Xenopus* Frog Brittle, Nasco, Madison, WI) at 10 to 15 pellets per frog twice weekly.

The experimental protocol was approved by the IACUC of the Sainte-Justine Hospital Research Center (University of Montreal) in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC).<sup>5</sup>

MS222 immersion and pentobarbital administration. We first evaluated 6 frogs with the 3 g/L MS222 bath immersion. This dose was chosen for its ability to cause complete cardiac arrest in 5 h<sup>23</sup> and therefore its potential to show electroencephalographic activity at



the beginning of anesthetic state to compare with a flat-line signal. After obtaining the results with this concentration, we evaluated a second group of 3 frogs with the 1 g/L MS222 bath immersion because this concentration has been used for euthanasia.<sup>23</sup> We mainly wanted to see whether MS222 at 1 g/L caused a similar CNS depression as that after 3 g/L. MS222 (ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate, Sigma–Aldrich, St Louis, MO) was weighed and added to reverse-osmosis–purified water. Sodium bicarbonate (Sigma–Aldrich) was added to bring the solution to a neutral pH (pH 7,2 for 1 g/L solutions and pH 6,9 for 3 g/L solutions) according to a pH meter (Accumet Basic AB15 pH meter, Fisher Scientific, Ottawa, Canada). Frogs were immersed in MS222 solution for 5 min and were then tested for the absence of withdrawal and righting reflexes prior to surgery. Frogs were returned into the MS222 solution after the surgical procedure, and the part of the animal in contact with air (to enable electroencephalography) was rinsed every 5 min with the MS222 solution until the end of the study. Care was taken to not immerse the electrode region. MS222 at 1 and 3 g/L is expected to stop heart activity after 5 h.<sup>23</sup> Prior to the experiments, we decided that if electroencephalographic recordings and cardiovascular parameters were stable at 2 h after bath immersion, all frogs would be injected intracoelomically (near the heart) with 0,5 mL sodium pentobarbital (240 mg/L; Euthanyl, Vetoquinol, Lavaltrie, Quebec, Canada), with each frog receiving approximately 1100 mg/kg.<sup>23</sup> All times reported in this study are from start of the immersion bath.

Implantation of electroencephalography electrodes. When anesthesia was confirmed, a 0,5-cm skin incision was made laterally (0,5 to 1 cm) to the skull midline and caudally to the eye. The fascia under the skin was detached, exposing the muscles. Muscle tissues were cut, and periosteum was scraped with a scalpel blade to expose the skull. A hole (diameter, 0,5

mm) was drilled into the exposed skull, and the screw was placed firmly in the bone. The surgery consisted of putting an electricity-conducting stainless-steel blunt-tip screw in the skull of all frogs so that the tip of the screw made contact with the pial surface of the right cerebral hemisphere. This recording screw was attached to a connector by using stainless steel bipolar electrode outputs of 200  $\mu\text{m}$  in diameter (Plastics 1, Roanoke, VA). We decided to use bipolar electrodes with this single output screw to have a more stable setup and the assurance that at least one electrode would record correctly, with the other one being used as a backup. Therefore, the monitoring configuration was single-ended, but bipolar electrodes outputs were used here for technical, stability, and monitoring consistency reasons. Similarly, a reference electrode was placed under the skin at the most caudal pole of the incision site near the midline and consisted of a copper crocodile clip (width, 2 mm; length, 1,25 cm) that was soldered to the wires of another bipolar connector output. The electroencephalography setup we used (Figure 1) is similar to one used previously, except that in the previous arrangement, the electrode was placed on the skull without direct contact to nervous tissue.<sup>3</sup> Total time (mean  $\pm$  1 SD) of surgery was  $9 \pm 3$  min. During recording, electrode placement was considered to be appropriate when signal peaks were approximately 50 to 60  $\mu\text{V}$ .

Physiologic monitoring. Once the screw electrode was placed in the skull, a crocodile clip electrode was attached on the skin of the frog to act as the reference electrode. The frog was replaced in the MS222 solution and placed in a Faraday cage to minimize electrical contamination (60 Hz) causing artifacts. Electroencephalographic signals and animal behaviors were recorded simultaneously by using a recording system (Stellate Harmonie, Natus Medical, San Carlos, CA) linked to a 32-channel Lamont amplifying unit and an infrared analogical video camera (Stellate Systems version 6.2e, Natus Medical) positioned

1,5 m in front of the Faraday cage. Data were acquired at 200 Hz, filtered at 0,1 to 35 Hz, and analyzed by using the Stellate Harmonie S program (Natus Medical). The experimenter was always present from the beginning of the procedures, and recordings were performed until complete cardiac arrest. Oxygen saturation and heart rate were measured by using a pulse oximeter (CANL 45SV, Med Associates, St Albans, VT). To collect data by using the pulse oximeter, the probe (model TDR-43, Transflectance Sensor, Med Associates) was positioned under the sternum of frogs placed in sternal recumbency.<sup>12,25</sup> Respiratory rate was evaluated by direct observation of nare, gular, or abdominal movements.

Electroencephalographic analysis. The amplitude and frequency of the electroencephalographic signal were collected at 15 min intervals. Care was taken to not include artifacts, such as the heartbeat of the frog or movements from the investigators, in the analysis window. A flat-line signal (no brain activity) was established at the end of each electroencephalographic recording (complete cardiac arrest for 10 to 15 min) to have a baseline electrical signal representative of the apparatus and environmental electrical contaminants. Consequently, baseline frequency was less than 2 Hz, and baseline amplitude was less than 3  $\mu$ V; signals exceeding these thresholds were analyzed. Recordings were analyzed by 2 observers, who were blinded to the experimental conditions.

Histopathology. At the end of the experiment, all frogs were weighed; the heads were removed, preserved in a buffered 10% formalin solution, and sent for analysis (Pathology Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Canada). Heads were decalcified and stained with hematoxylin–eosin–safran. Transverse sections ( $n = 3$ , that is, the middle and each end of the drill hole) of each head were observed under light microscopy

(Dr Pierre Hélie, DMV, DACVP) to determine whether brains were intact during the recording and to confirm the location of the electrode.

Statistics. Differences in heart rate, oxygen saturation, amplitude, and frequency values were analyzed for statistical significance (version 8.2, SAS Software, SAS Institute, Cary, NC). The repeated-measures linear model was used for analysis, and statistical significance was set at a  $P$  value of less than 0,05.

## 2.4 Results

Evaluation of the histology slides of the *Xenopus* skulls confirmed that the electrodes in all frogs were placed correctly for electroencephalographic recording. Figure 2 shows a frontal section the skull where a trepanation hole is seen, located just above the cerebral hemisphere, and Figure 3 shows a section that lacks a trepanation hole (continuous bone on the dorsal aspect of the skull). All frogs were free of brain lesions and signs of nervous tissue ischemia, according to microscopic observations.

Baseline values (mean  $\pm$  SEM) prior to bath immersion were: respiratory rate,  $12 \pm 2$ . breaths per minute; heart rate,  $51 \pm 6$  bpm; and oxygen saturation,  $88,0\% \pm 6,0\%$ . Withdrawal and righting reflexes were absent at approximately  $6,7 \pm 1,2$  min (mean  $\pm$  1 SD) after immersion of frogs in 1 g/L MS222 and at  $5 \pm 0$  min after immersion in 3 g/L MS222. When compared with the baseline value, remained unchanged after immersion in the 1 g/L MS222 solution but was significantly ( $P < 0,05$ ) greater at the 30, 45, and 90 min time points after immersion in 3 g/L MS222 (Figure 4). The 3 g/L immersion significantly ( $P < 0,05$ ) decreased oxygen saturation from  $88\% \pm 6\%$  at baseline to  $62\% \pm 10\%$  at 1 h after induction, with a

progressive return to normal values over time (no significant difference at other time points; Figure 5). In all frogs, the respiratory frequency was 0 breaths per minute at 15 min after the start of the immersion bath and stayed depressed throughout the 2 h monitoring period.

After the MS222 immersion bath, electroencephalographic amplitudes were significantly ( $P < 0,05$ ) lower at 30 min, with values ranging from  $59,7 \pm 12,3 \mu\text{V}$  at 15 min to  $11,9 \pm 5,8 \mu\text{V}$  at 30 min and stayed below this amplitude for the remainder of the study (Figure 6). Signal frequency varied between  $3,2 \pm 0,9$  and  $7,1 \pm 2,5$  for the entire electroencephalographic recording session (Figure 7). Data from all frogs, regardless of the concentration of the immersion bath, were pooled, given the lack of differences in the amplitude and frequency of the electroencephalographic signals. Representative electroencephalographic signals recorded at 15 min and the end of the study (prior to pentobarbital administration) are shown in Figure 8. Note that the terminal phase electroencephalographic amplitude is very low and the electrocardiographic signal became clearly apparent.

Intracerebral injection of 0,5 mL (240 mg/mL) sodium pentobarbital progressively decreased heart rate in all frogs, achieving complete arrest  $3,2 \pm 1,7$  min after injection.

## 2.5 Discussion

Continuous bath immersion of *X. laevis* frogs in MS222 at a concentration of 1 or 3 g/L for euthanasia induces depression of CNS activity without any overt modification of cardiovascular parameters for 2 h after immersion. Cardiac arrest has been shown to occur at approximately 5 h after a 1 h immersion in MS222,<sup>23</sup> our current study shows that brain

activity is strongly reduced within 30 min of immersion. Recorded low amplitudes (less than 12  $\mu\text{V}$ ) and frequencies (3 to 7 Hz) are representative of a very deep level of anesthesia ( $\theta$  and  $\delta$  waves).<sup>19</sup> Our study therefore clearly shows that MS222 causes profound CNS depression in frogs within the first 30 min of bath immersion.

Because some frogs in an earlier study recovered after a 1 h immersion in 1 g/L MS222,<sup>23</sup> immersion of frogs in 1 g/L MS222 for a specified time period should be avoided as a method of euthanasia.<sup>7</sup> However, the CNS depression after this treatment is sufficient for surgical procedures or organ collection, and intracoelomic pentobarbital can be added to ensure appropriate euthanasia of the frog. With the 3 g/L immersion bath, terminal tissue collection and nonsurvival surgery can be performed within 30 min, in light of the marked CNS depression.

Various electroencephalographic indicators of anesthesia depth have been identified in humans and other mammals.<sup>8,14,16,19,20,24</sup> Frequency bands typically are categorized as  $\delta$  (0 to 4 Hz),  $\theta$  (4 to 8 Hz),  $\alpha$  (8 to 13 Hz), and  $\beta$  (13 to 32 Hz).<sup>16,24</sup> Deep anesthesia shows predominantly  $\delta$  and  $\theta$  bands, that is, frequencies of 0 to 8 Hz.<sup>19</sup> In the current study, mean frequencies at 15 min intervals ranged from 2 to 8 Hz in all frogs throughout the 2 h recording session, suggesting a deep state of anesthesia. Electric activity from the heart prevented the recording of a complete electroencephalographic flat-line signal, but the regularity of the heart beat signal (shape and frequency) allowed us to differentiate it from cerebral activity. Baseline electroencephalographic recordings were not obtained from unanesthetized frogs because doing so was considered impractical in a freely moving aquatic animal.

Compared with the data gathered in the current study, other studies have found higher amplitude electroencephalography signals in awake and resting amphibians and high-frequency signals are mostly inhibited while the frogs are resting.<sup>9,18</sup> Frogs and mammals have similar electroencephalographic frequencies and amplitudes.<sup>18</sup> However, the electroencephalographic features of anesthesia have not yet been clarified in frogs. In fish, MS222 leads to severe depression (amplitude and frequency) of the electroencephalogram.<sup>11,26</sup>

We considered our frogs to be anesthetized after 5 to 8 min of immersion because they had lost the righting and withdrawal reflexes frogs.<sup>6,15,22</sup> Interestingly, the 3 g/L MS222 solution decreased the oxygen saturation significantly after the 1 h immersion, and heart rate was significantly greater with the 3 g/L compared with the 1 g/L solution. However, heart rate did not significantly differ from baseline with either solution and remained stable throughout the recording period. A similar range for heart rate and oxygen saturation have previously been recorded in adult *Xenopus* frogs during anesthesia;<sup>15</sup> however, depression can occur in young frogs.<sup>12</sup> Therefore, in adult *Xenopus* frogs, MS222 appears to have little effect on the heart rate and oxygen saturation during the first hour after bath immersion.

Intracoelomic injection of sodium pentobarbital at 2 h after immersion caused the cessation of heart function and accomplished euthanasia. This combination of agents may be particularly appropriate if tissue samples need to be collected rapidly after MS222 immersion. However, pentobarbital can damage tissues submitted for histology,<sup>25</sup> whereas MS222 does not appear to have this effect.<sup>21</sup> Although lower doses of pentobarbital (for example, 100 mg/kg) are reported to be effective for euthanasia when used in the absence of anesthesia,<sup>25</sup> a recent study showed that 1100 mg/kg sodium pentobarbital combined with sodium phenytoin (141 mg/kg) was necessary to achieve euthanasia of frogs within 1 h.<sup>23</sup> More studies are

required to identify the appropriate pentobarbital dose and time of the administration for the anesthesia or euthanasia of frogs in conjunction with MS222 deep anesthesia.

Although MS222 acts similarly as other local anesthetics (such as lidocaine and benzocaine) by blocking sodium currents,<sup>10</sup> it has widely been used as a general anesthetic in fish and amphibians. Because high doses of MS222 lead to both sensory desensitization and motor block,<sup>21</sup> the appropriateness of their use is questionable given the possibility of paresis or paralysis. MS222 therefore may inhibit the sensory and motor functions of the peripheral nervous system in frogs without having an effect on the CNS. Our study clearly demonstrates that MS222 leads to profound CNS depression, compatible with deep levels of anesthesia, in frogs. This study is the first to demonstrate that MS222 is an anesthetic—it is capable of causing loss of consciousness as characterized by the presence of  $\delta$  and  $\theta$  waves in the cerebral cortex.<sup>8,14,16,19,20,24</sup>

In conclusion, tricaine methanesulfonate (MS222) at a concentration of 1 or 3 g/L in an immersion bath for frogs leads to marked depression of cerebral activity that develops within 30 min after immersion and lasts for at least 2 h. The deep plane of anesthesia after 30 min enables tissue collection and surgical procedures. Beyond 1 h, oxygen saturation is low with the 3 g/L solution; the 1 g/L concentration should be used to ensure better tissue oxygenation. Euthanasia of MS222-anesthetized frogs can be accelerated by administering intracoelomic pentobarbital, which causes cardiac arrest in less than 5 min.



## 2.6 Acknowledgment

We thank Dr Lionel Carmant from the neurologic research laboratory at Ste Justine Hospital Research Center for the electroencephalographic material used in this study, Dr Gregor Andelfinger from the cardiology research laboratory at Ste Justine Hospital Research Center for giving us the frogs, and Marie-Thérèse Parent for preparing the figures.

## 2.7 References

1. Akula KK, Dhir A, Kulkarni SK. 2009. Effects of various antiepileptic drugs in a pentylenetetrazol-induced seizure model in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 31: 423–432.
2. American Veterinary Medical Association. [Internet]. 2007. AVMA guidelines on euthanasia, 2007 updated 1. [Cited July 2011]. Available at: [http://www.avma.org/issues/animal\\_welfare/euthanasia.pdf](http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf)
3. Balasandaram K, Ramalingam K, Selvarajan VR. 1997. Bioelectrical activity of brain in *Rana tigrina* (Daudin) in response to phosalone poisoning. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 118C:229–231.
4. Beck CW, Slack JMW. 2001. An amphibian with ambition: a new role for *Xenopus* in the 21st century. *Genome Biol* 2:reviews1029.1–reviews1029.5.
5. Canadian Council on Animal Care. 1993. Guide to the care and use of experimental animals, vol 1, 2nd ed. Ottawa (Canada): Canadian Council on Animal Care.
6. Crawshaw GJ. 1993. Amphibian medicine, p 131–139. In: Fowler M, editor. *Zoo and wild animal medicine: current therapy* 3. Philadelphia (PA): WB Saunders.

7. Downes H. 1995. Tricaine methanesulfonate in amphibian: a review. *Bull Assoc Rept Amph Vet* 5:11–16.
8. Ekström PM, Short CE, Geimer TR. 1993. Electroencephalography of detomidine–ketamine–halothane and detomidine–ketamine–isoflurane anesthetized horses during orthopedic surgery. A comparison. *Vet Surg* 22:414–418.
9. Fang G, Chen Q, Cui J, Tang Y. 2012. Electroencephalogram bands modulated by vigilance states in anuran species: a factor analytic approach. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 198:119–127.
10. Frazier DT, Narahashi T. 1975. Tricaine (MS222): effects on ionic conductances of squid axon membranes. *Eur J Pharmacol* 33:313–317.
11. Gentle MJ. 1971. Electrical activity in the optic tectum and color changes in the minnow (*Phoxinus phoxinus* L.). *J Exp Biol* 55:641–649.
12. Goulet F, Hélie P, Vachon P. 2010. Eugenol anesthesia of *Xenopus laevis* frogs of different body weights. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 49:460–463.
13. Green SL. 2010. The laboratory *Xenopus* sp. Boca Raton (FL): CRC Press.
14. Grocott HP, Davie S, Fedorow C. 2010. Monitoring of brain function in anesthesia and intensive care. *Curr Opin Anaesthesiol* 23:759–764.
15. Guénette SA, Hélie P, Beaudry F, Vachon P. 2007. Eugenol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Vet Anaesth Analg* 34:164–170.
16. Hudetz AG, Vizuete JA, Pillay S. 2011. Differential effects of isoflurane on high-frequency and low-frequency  $\gamma$  oscillations in the cerebral cortex and hippocampus in freely moving rats. *Anesthesiology* 114:588–595.

17. Khoka M, Wallingford J, Blitz I, Conlon FL, Harland R, Lau N, Miller A, Philpott A, Stukenberg T, Veenstra G, Zorn A. [Internet]. 2011. 2011 *Xenopus* Community White Paper. [Cited August 2011]. Available at: [http://www.xenbase.org/community/static/xenopuswhitepaper/2011/XWP\\_xenbase.jsp](http://www.xenbase.org/community/static/xenopuswhitepaper/2011/XWP_xenbase.jsp).
18. Laming PR. 1982. Electroencephalic correlates of behavior in the anurans *Bufo regularis* and *Rana temporaria*. *Behav Neural Biol* 34:296–306.
19. Otto K, Short CE. 1991. Electroencephalographic power spectrum analysis as a monitor of anesthetic depth in horses. *Vet Surg* 20:362–371.
20. Otto KA, Cebotari S, Höffler HK, Tudorache I. 2012. Electroencephalographic narcotrend index, spectral edge frequency, and median power frequency as guide to anaesthetic depth for cardiac surgery in laboratory sheep. *Vet J* .
21. Selden S. 1989. Local anesthesia drugs and techniques, p 15–28. In: Muir WW, Hubbell JAE, editors. *Handbook of veterinary anesthesia*. St Louis (MO): CV Mosby.
22. Stetter MD, Raphael B, Indiviglio F, Cook RA. 1996. Isoflurane anesthesia in amphibians: comparison of 5 application methods, p 255–257. In: *Proceedings American Association of Zoo Veterinarians 1996*. Yulee (FL): AAZV.
23. Torreilles SL, McClure DE, Green SL. 2009. Evaluation and refinement of euthanasia methods for *Xenopus laevis*. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48:512–516.
24. Vachon P, Dupras J, Prout R, Blais D. 1999. Electroencephalographic recordings in anesthetized rabbits: comparison of ketamine–midazolam and telazol with or without xylazine. *Contemp Top Lab Anim Sci* 38:57–61.

25. Wright KM. 2001. Restraint techniques and euthanasia, p 111–122. In: Wright KM, Whitaker BR, editors. Amphibian medicine and captive husbandry. Malabar (FL): Krieger Publishing.
26. Yoshikawa H, Yokoyama Y, Ueno S, Mitsuda H. 1991. Electroencephalographic spectral analysis in carp, *Cyprinus carpio*, anesthetized with high concentrations of carbon dioxide. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 98:437–444.

## 2.8 Legend to figures

Figure 1. Electrode placement on a *X. laevis* frog for electroencephalographic recording, using a conducting screw (right) and a crocodile clip (left). The frog is partially immersed in the MS222 solution (1 or 3 g/L concentration).

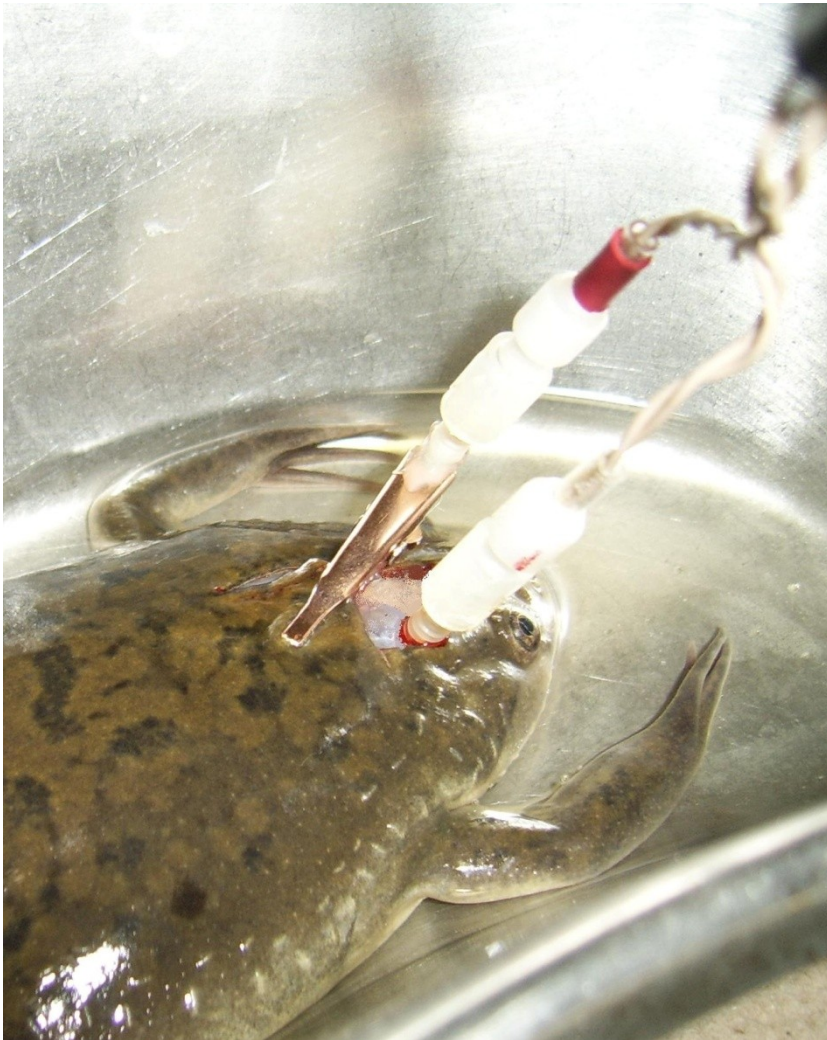


Figure 2. Photomicrograph of a histologic section of the head showing the trepanation hole (distance between the small arrow heads) and the undamaged brain (large arrow). Hematoxylin–eosin–saffron stain.

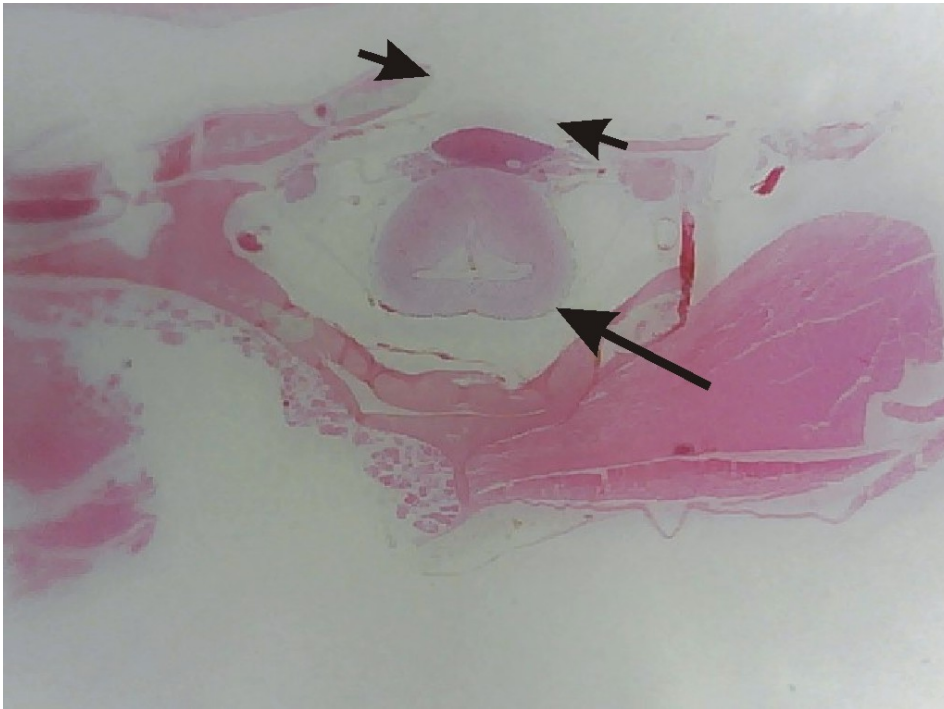


Figure 3. Photomicrograph of a histologic section anterior to a trepanation showing the undamaged brain (arrow) and surrounding bone of the skull. Hematoxylin–eosin–saffron stain.



Figure 4. Heart rate (mean  $\pm$  SEM) of *X. laevis* frogs after immersion in MS222 at 3 g/L ( $n = 6$ ) or 1g/L ( $n = 3$ ) for the duration of the study (2 h).

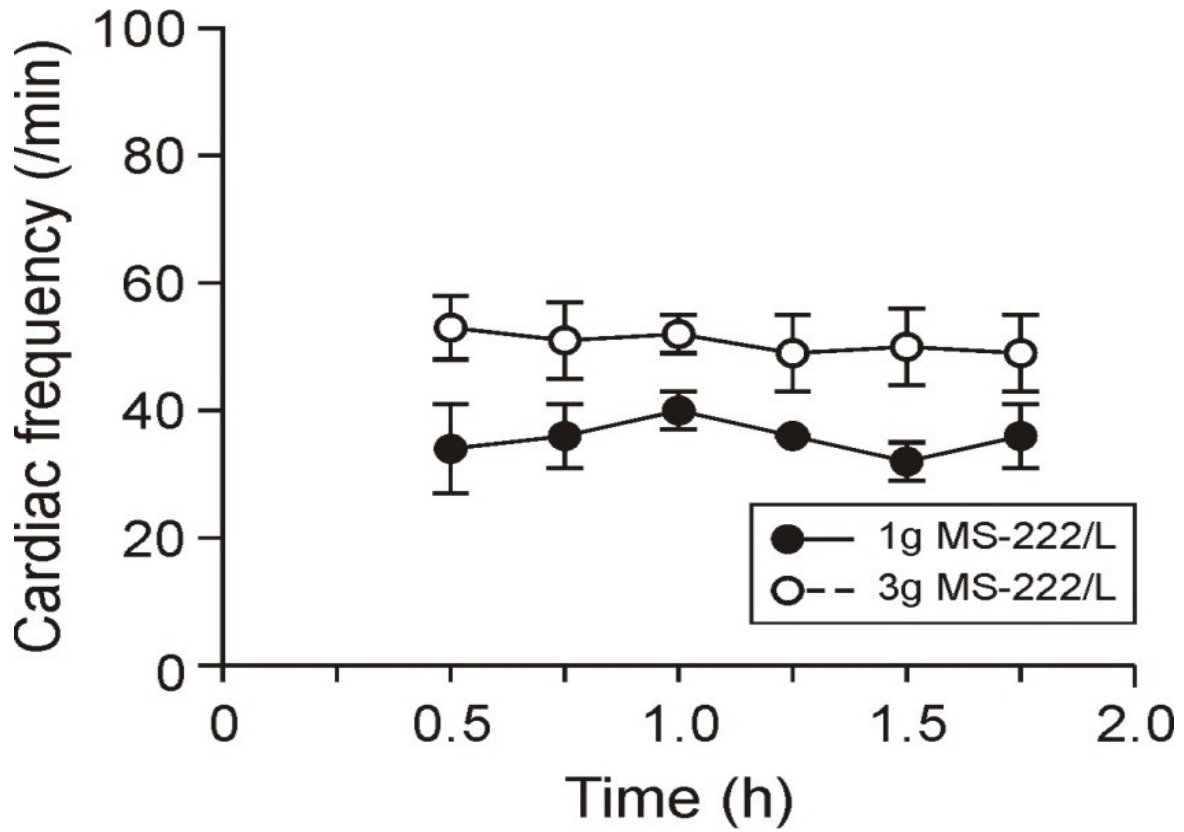




Figure 5. Oxygen saturation (mean  $\pm$  SEM) of *X. laevis* frogs after immersion in MS222 at 3 g/L ( $n = 6$ ) or 1g/L ( $n = 3$ ) for the duration of the study (2 h).

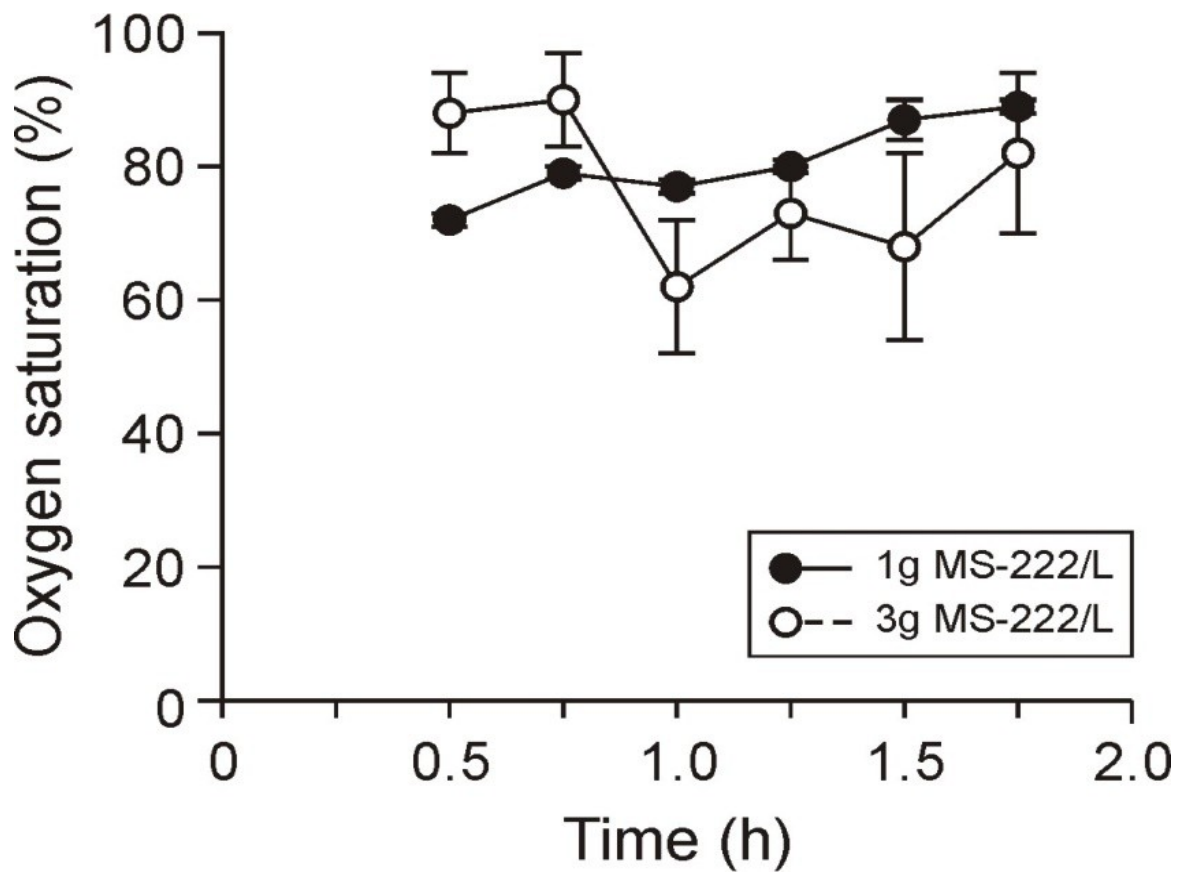


Figure 6. Electroencephalographic (EEG) amplitude (mean  $\pm$  SEM) after immersion of *X. laevis* frogs in MS222 ( $n = 9$ ; 6 frogs at 3g/L and 3 frogs at 1g/L) for the duration of the study (2 h).

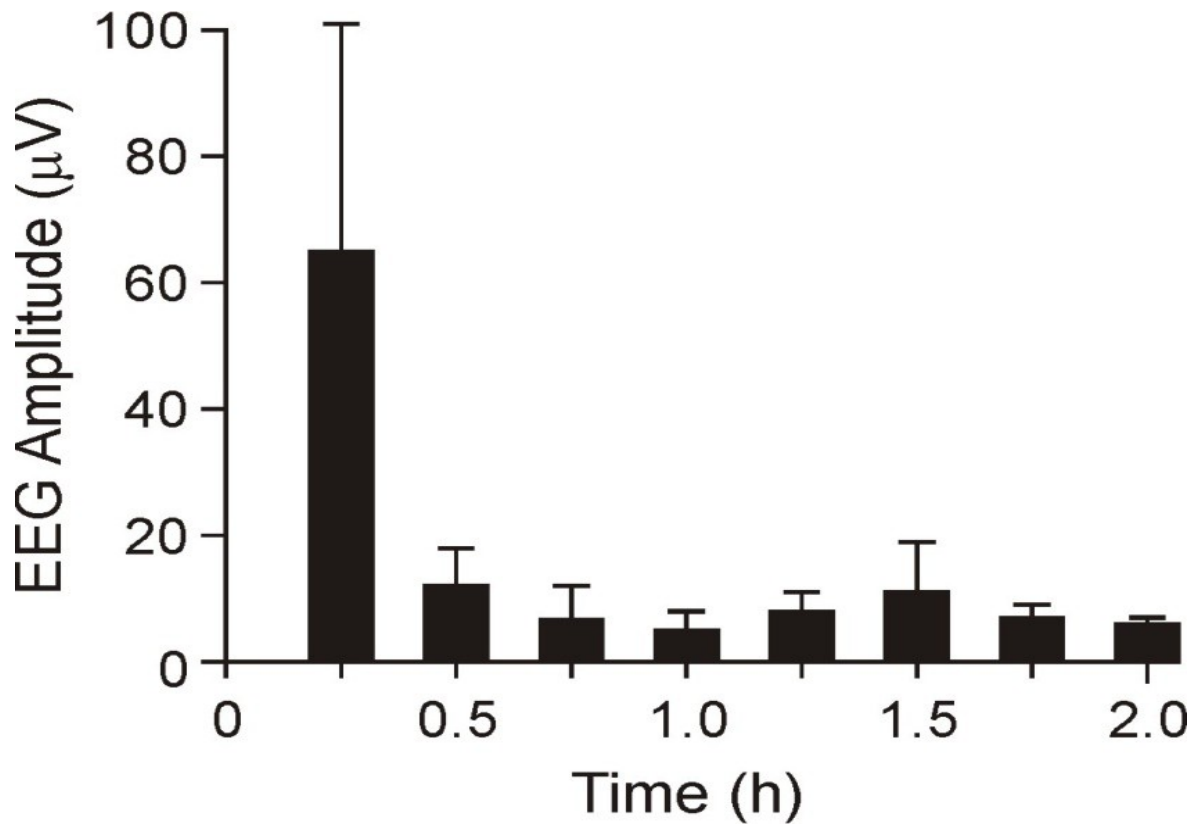


Figure 7. Electroencephalographic (EEG) frequency (mean  $\pm$  SEM) after immersion of *X. laevis* frogs in MS222 ( $n = 9$ ; 6 frogs at 3g/L and 3 frogs at 1g/L) for the duration of the study (2 h).

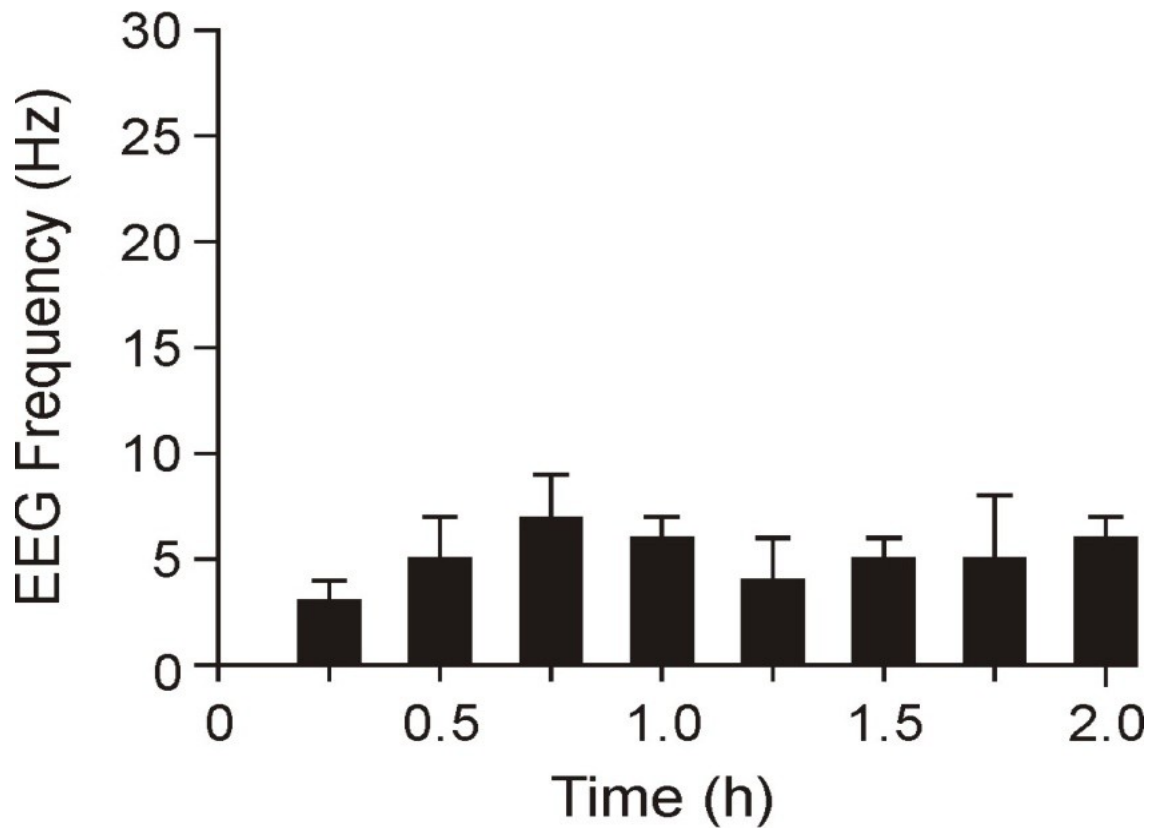
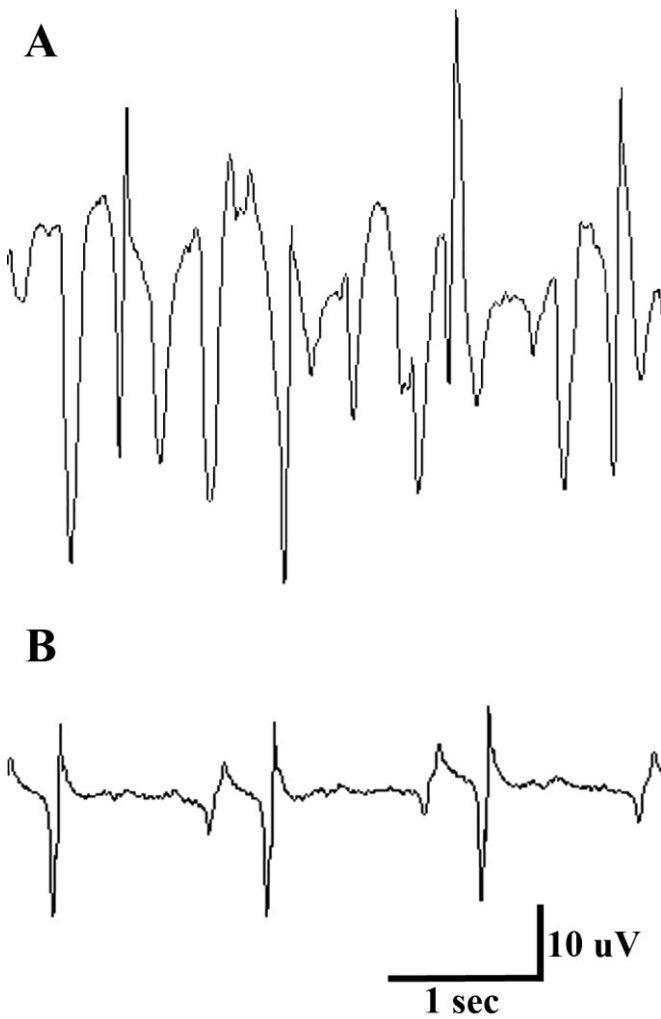


Figure 8. Representative electroencephalographic recording of a *X. leavis* frog at (A) 15 min after induction and (B) at the end of the recording session (prior to pentobarbital administration) after immersion in 3 g/L MS222. Note the high-amplitude low-frequency tracing at the early time point and the low-amplitude electroencephalographic recording at the late time point. Bars: x axis = 1 s; y axis = 10  $\mu$ V.



## Chapitre 4 : Discussion générale

Pour l'anesthésie des amphibiens, la littérature suggère des concentrations de 0,2 g/L à 5 g/L de tricaine méthanesulfonate en bain d'immersion (Downes, 1995). Alors que la tricaine méthanesulfonate est le médicament anesthésiant le plus utilisé chez les anoures, peu de recherches existent sur ses effets pharmacologiques chez les grenouilles *Xenopus laevis*. Il importait donc de donner aux utilisateurs de grenouilles *Xenopus laevis* des données plus précises sur l'utilisation du MS-222 en bain d'immersion en cherchant à comprendre la relation-dose-concentration-effets associée à ce médicament chez cette espèce.

Nous avons déterminé que des bains d'immersion de 20 minutes de 1 ou 2 g/L produisaient une anesthésie chirurgicale de 30 ou 60 minutes respectivement. Afin d'évaluer la pharmacodynamique des bains d'immersion de MS-222, nous avons utilisé un ensemble de sept paramètres et de tests : le rythme respiratoire, la fréquence cardiaque, la saturation en oxygène, le réflexe de retrait, le réflexe de recouvrement, le test à l'acide acétique et l'incision de la peau et des muscles abdominaux. Le réflexe cornéen n'a pas été utilisé lors de nos manipulations puisque les grenouilles *Xenopus laevis* ne possèdent pas de paupières (Green, 2010). Chez les amphibiens, la définition commune d'anesthésie est la perte du réflexe de recouvrement et du réflexe de retrait suivis de la diminution et même de l'arrêt des mouvements abdominaux et gulaires (Crawshaw, 1993). Nous avons décidé d'ajouter le test à l'acide acétique et l'incision de la peau et des muscles afin de mieux définir l'état d'anesthésie et d'analgésie des animaux. Le test à l'acide acétique permet de confirmer un niveau d'analgésie cutanée adéquat de 30 minutes à 1 g/L de MS-222 en bain d'immersion et de 60

minutes à 2 g/L. Il semble également être utile pour déterminer le niveau d'anesthésie chez cette espèce lors de l'utilisation du bain d'immersion de MS-222, puisque le retour de la réponse au AAT se fait environ au même moment que la réapparition du réflexe de recouvrement et que la réaction à l'incision cutanée et musculaire pour les deux doses utilisées. Ceci n'est pas le cas avec l'utilisation de tous les médicaments anesthésiques. Par exemple, en utilisant l'eugénol en bain d'immersion de 350 mg/L chez les petites grenouilles *Xenopus laevis* ( $7,5 \pm 2,1$  g), celles-ci réagissent à l'incision beaucoup plus tôt qu'au AAT et démontrent les réflexes beaucoup plus tard (Goulet et al., 2010). Nous constatons alors que l'AAT est plus idéal ou égal aux réflexes de retrait et de recouvrement pour ces deux molécules utilisées en bain d'immersion, mais en serait-il de même si le MS-222 avait été administré par la voie intracoelomique? Alors que le MS-222 se retrouve en contact direct avec la peau lors de l'absorption en bain d'immersion, une certaine partie de la dose passerait par les organes filtres lors de l'injection intracoelomique. Ceci permettrait alors l'hydrolyse du lien ester et diminuerait ainsi l'effet anesthésique avant d'accéder à la peau. Il serait alors pertinent de regarder si le médicament se rend en concentration nécessaire au tissu cutané pour permettre une analgésie adéquate. Il faut donc idéalement utiliser l'AAT et le réflexe de recouvrement conjointement pour évaluer l'anesthésie. Il aurait également été intéressant de mesurer les réponses à l'aide du test de Hargreaves lors du test à l'acide acétique pour voir si ce dernier peut également nous aider à déterminer le niveau d'analgésie et d'anesthésie avec le bain d'immersion de MS-222 puisque celui-ci évalue plutôt la réaction aux stimuli thermiques et non chimiques comme l'AAT (Coble et al., 2011). Le test de Hargreaves n'était pas validé pour l'analgésie des anoues au moment de l'expérimentation, mais il permettrait d'éviter les effets cutanés de l'AAT (Coble et al., 2011).

Le MS-222 administré en bain d'immersion chez les grenouilles *Xenopus laevis* n'a pas d'effet significatif sur le rythme cardiaque à des concentrations de 1 et 2 g/L. Il a pourtant un effet dépresseur sur le rythme cardiaque chez les grenouilles *Rana pipiens* exposées durant 4 heures à des concentrations de 200 à 800 mg/L (Cakir & Strauch, 2005). Par contre, il est à noter que les grenouilles *Rana pipiens* sont plus petites (40 à 60 g) et que l'exposition de 4 heures au MS-222 est 12 fois plus élevée que ce que nous avons utilisé (Cakir & Strauch, 2005). Même si la comparaison est difficile à établir entre ces deux études, nous pouvons tout de même constater que la diminution du rythme cardiaque chez les grenouilles *Rana pipiens* est significative seulement à partir de 1 à 2 heures d'exposition (Cakir & Strauch, 2005). Cela permet d'anticiper un effet potentiellement similaire avec une augmentation de la dose ou de la durée d'exposition chez les grenouilles *Xenopus laevis*. Cependant, l'exposition prolongée aux bains de 1 g/L et de 3g/L MS-222 durant la deuxième expérience n'a pas affecté significativement la fonction cardiovasculaire. L'eugénol utilisé en bain d'immersion de 350 mg/L chez les grenouilles *Xenopus laevis* de taille similaire à celles utilisées durant nos expériences n'a également pas eu d'effet significatif sur la fréquence cardiaque (Guénette et al., 2007), alors que chez les petites ( $7,5 \pm 2,1$  g) et moyennes ( $29,2 \pm 7,4$  g) grenouilles *Xenopus laevis*, le bain d'immersion a un effet dépresseur significatif sur la fonction cardiovasculaire (Goulet et al., 2010). Le bain d'immersion de plus d'une heure de 0,2 g/L de benzocaïne a également un effet dépresseur sur le rythme cardiaque des grenouilles *Rana pipiens* (40 à 60 g) (Cakir & Strauch, 2005). Il serait donc conseillé d'avoir une surveillance anesthésique adéquate de la fonction cardiaque lors de l'anesthésie de grenouilles *Xenopus laevis* de petite ou de moyenne taille ou même d'étudier les effets de telles concentrations de

bain d'immersion de MS-222 chez celles-ci pour savoir si la taille a un effet sur les paramètres surveillés lors de l'anesthésie.

Finalement, le retour à la respiration normale à la suite du bain d'immersion lors de nos expériences (vers 15 minutes pour le bain de 1 g/L et vers 30 à 45 minutes pour le bain de 2 g/L) s'est produit avant la réaction à l'incision cutanée et musculaire. Lors de l'utilisation de l'eugénol en bain d'immersion de 350 mg/L, les grenouilles *Xenopus laevis* subissent également une diminution significative du rythme respiratoire, cependant le retour de la fonction respiratoire se produit environ au même moment que le retour des réflexes (Guénette et al., 2007). La diminution ou l'arrêt des mouvements respiratoires font partie de la définition d'anesthésie chirurgicale chez les anoues pour bien des auteurs. Par contre, nous constatons que ces caractéristiques peuvent être présentes ou non lors d'anesthésie chirurgicale. De plus, le retour au rythme respiratoire de base ne semble pas être la conséquence de changements hémodynamiques ou de saturation en oxygène puisque le rythme cardiaque et la saturation en oxygène ne sont pas significativement changés par l'anesthésie au MS-222 aux deux concentrations étudiées. Il n'en est pas de même lors de la surdose en bain d'immersion de 3 g/L, puisque la saturation en oxygène diminue significativement vers une heure après le début de l'immersion et revient progressivement à la valeur de base. Une hypothèse serait que la peau joue un plus grand rôle dans la fonction respiratoire des *Xenopus laevis* suite à l'hypoxygénation sanguine et des tissus. Si la perméabilité de la peau fonctionne effectivement par diffusion passive, une chute soudaine en niveau d'oxygène à l'intérieur du corps de l'animal pourrait augmenter la diffusion pour atteindre un niveau d'équilibre. Nos résultats démontrent une saturation en oxygène stable avec le bain de 1 g/L et suggèrent que la



peau des grenouilles *Xenopus laevis* semble avoir un rôle beaucoup plus important lors de l'arrêt respiratoire.

Un des désavantages courants des anesthésiques chez les amphibiens est le réveil prolongé. En effet, des médicaments comme la kétamine, le pentobarbital et le méthoxyflurane peuvent produire chez différentes espèces d'amphibiens des durées de réveil aussi longues que 18 heures (Wright, 2001), 9 heures (Kaplan, 1969) et 7 heures (Wass et al, 1974) respectivement. Nous avons démontré que les grenouilles *Xenopus laevis* anesthésiées avec un bain d'immersion de 1 g/L et 2 g/L de MS-222 avaient un retour complet des réflexes, des mouvements spontanés et de la fonction respiratoire autour de 1 et 2 heures respectivement. Cela signifie un réveil d'anesthésie de 1 à 2 heures selon la concentration utilisée, ce qui est très raisonnable et pratique dans un environnement de recherche. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Guénette et collaborateurs (2007) où l'anesthésie au bain d'immersion d'eugénol chez les grenouilles *Xenopus laevis* permettait un retour complet des réflexes et de la fonction respiratoire en 2 heures. Cependant, à la suite du bain d'immersion, l'utilisation d'une telle concentration d'eugénol ne permet qu'une anesthésie chirurgicale d'environ 30 minutes (Guénette et al., 2007) comparée à celle de 60 minutes obtenue avec un bain de 2 g/L de MS-222. De façon plus efficace, chez plusieurs autres espèces d'amphibiens, lorsque le bain de benzocaïne a été comparé à un bain de 0,5 g/L de MS-222, l'induction de l'anesthésie s'est montrée plus rapide pour environ un même temps de réveil causant un temps d'anesthésie prolongé avec l'utilisation de la benzocaïne (Cecala et al., 2007).

Alors qu'il est très utile d'avoir des données pharmacodynamiques pour planifier l'utilisation du MS-222 en bain d'immersion chez les grenouilles *Xenopus laevis*, il est tout aussi intéressant d'avoir des données pharmacocinétiques. Nous avons utilisé la

chromatographie liquide à haute performance combinée à la spectrométrie de masse en tandem pour déterminer la concentration plasmatique de MS-222 à différents moments prédéterminés à la suite de l'administration aux grenouilles. La spectrométrie de masse en tandem fait partie des méthodes de choix puisqu'elle est très sensible et spécifique, nécessitant qu'une petite quantité de plasma (50 µL). La masse des fragments de la molécule de tricaïne méthanesulfonate est propre à celle-ci et c'est ce qui permet une telle sensibilité et spécificité de la méthode. La chromatographie liquide à haute performance est faite avant la spectrométrie de masse afin de séparer la molécule de MS-222 de ses isomères et des contaminants (Holcapek et al., 2008).

Nous avons extrait trois importants paramètres pharmacocinétiques ( $C_{max}$ ,  $T_{1/2}$ , AUC) qui permettront aux utilisateurs de *Xenopus laevis* de prédire le comportement du MS-222 en utilisant le bain d'immersion de 20 minutes à 2 g/L. Il est difficile d'extraire le volume de distribution et la biodisponibilité puisque la dose administrée nous est inconnue. Effectivement, la tricaïne méthanesulfonate en bain d'immersion est absorbée chez l'amphibien jusqu'à l'obtention d'un plateau plasmatique, sans nécessairement que la concentration soit la même dans l'animal et dans l'eau (Downes, 1995). Il est donc difficile de savoir à quel moment ce plateau a été atteint (et même s'il a été atteint) et à quel point l'animal avait commencé à métaboliser le médicament lors de la prise du premier échantillon sanguin à 15 minutes (après induction). Par contre, nous savons d'emblée que la concentration plasmatique maximale de 38,7 µg/ml est atteinte à 15 minutes ou plus tôt après l'immersion. Nous avons déterminé que le temps de demi-vie de la tricaïne méthanesulfonate en bain d'immersion est de 3,2 heures. De façon similaire, un temps de demi-vie de 4 heures a été obtenu lors de la pharmacocinétique du bain d'immersion d'eugénol chez les grenouilles

*Xenopus laevis* (Guénette et al., 2007). Un temps de demi-vie beaucoup plus court (environ 70 minutes), à des températures entre 23 et 37,5 °C, a été observé lors de l'injection intracoelomique de MS-222 chez les grenouilles *Rana pipiens* (Wayson et al, 1976). Le temps de demi-vie court de l'administration intracoelomique du MS-222 chez les *Rana pipiens* suggère qu'il serait possible d'utiliser cette voie d'administration à des doses de 150 mg/kg plusieurs journées consécutives, mais il faudrait plus d'études pour déterminer si cette concentration serait appropriée chez les grenouilles *Xenopus* et si elle produirait des effets néfastes sur les organes. De plus, certaines grenouilles démontrent de l'érythème cutané temporaire lors de l'administration de MS-222 en bain d'immersion (Wright, 2001). Nous pouvons confirmer que, lors d'une administration unique à des doses de 1 et 2 g/L, il n'y a pas de changements histologiques cutanés 24 heures après l'administration. Puisque le médicament est éliminé rapidement après l'exposition au bain d'immersion de MS-222 et qu'il n'y a aucun changement histologique 24 heures après l'exposition topique (bain d'immersion), il semble raisonnable d'utiliser le MS-222 à cette concentration de façon sécuritaire pour au moins deux journées consécutives. Plus de recherches seraient nécessaires afin de déterminer les effets à court et à long terme d'une utilisation journalière d'un bain d'immersion et de l'administration intracoelomique chez cette espèce.

Nous avons également évalué l'effet du bain de tricaine méthanesulfonate sur la dépression du système nerveux central des grenouilles *Xenopus laevis* durant l'euthanasie. En effet, il avait été constaté par Torreilles et collaborateurs (2009) que l'euthanasie des grenouilles *Xenopus laevis* avec cette méthode requérait plusieurs heures à des doses de 3 et 5 g/L et était inefficace à 1 et 2 g/L, l'arrêt cardiaque étant long à atteindre. Des temps d'arrêt cardiaque prolongés ont également été obtenus avec de grandes doses de pentobarbital sodique

et ainsi qu'avec l'application cutanée de benzocaïne (Torreilles et al., 2009). Notre hypothèse était qu'il devrait y avoir une dépression importante du système nerveux central, et ceci bien avant la cessation du rythme cardiaque. Alors que nous avons effectivement constaté une diminution de l'activité du système nerveux central environ 30 minutes après le début de l'immersion à des concentrations de 1 et 3 g/L, l'arrêt complet du signal d'EEG n'a pu être décelé avant l'arrêt cardiaque causé par le pentobarbital. Le signal, après 30 minutes d'immersion, est caractérisé par une diminution significative de l'amplitude et de la fréquence du signal d'EEG et ces caractéristiques sont conservées jusqu'à la fin de l'enregistrement. Tel que démontré au chapitre 3, ces caractéristiques sont rencontrées sur le signal d'EEG de mammifères anesthésiés avec différents médicaments ainsi que chez les amphibiens en état de sommeil, suggérant une perte de conscience et donc une absence de la perception de la douleur. Alors que nous ne pouvons pas démontrer la perte de fonction cérébrale durant l'euthanasie, nous pouvons affirmer que le MS-222 aux concentrations de 1 g/L et 3 g/L induit effectivement une diminution d'activité au niveau du SNC, que la molécule se rend au SNC en concentration efficace pour produire cet effet et qu'elle ne fait pas que paralyser l'animal. Une telle utilisation de l'électroencéphalogramme pourrait nous permettre d'affirmer ou d'infirmer l'effet dépresseur sur le SNC d'autres médicaments utilisés principalement chez les amphibiens tels l'eugénol et la benzocaïne.

Même si la diminution d'activité du SNC sur le signal est évidente, le signal comporte des contaminants diminuant notre capacité à l'analyser. L'augmentation du bruit sur le signal pourrait être due en partie à l'utilisation de l'acier inoxydable pour la fabrication des électrodes. En effet, lors d'essais *in vitro*, certains matériaux comme l'argent et le chlorure d'argent ne semblent pas causer le niveau de bruit expérimenté avec l'utilisation de l'acier

inoxydable (Tallgren *et al.*, 2005). Dans un deuxième temps, le recouvrement de l'électrode avec un matériau isolant aurait pu diminuer la présence d'artéfacts de contact (Tallgren *et al.*, 2005). Notre signal était de qualité acceptable pour atteindre notre objectif de départ qui était de vérifier la perte d'activité au niveau cérébral; il pourrait être amélioré pour l'analyse en profondeur des paramètres électroencéphalographiques classiquement utilisés durant l'anesthésie.

Il aurait été intéressant d'avoir des valeurs de base de signal d'EEG sur la grenouille *Xenopus laevis* éveillée aux fins de comparaison. Vu la nature complètement aquatique de l'animal, cela posait quelques défis du point de vue électrique et pratique et nous avons donc décidé d'utiliser une concentration de MS-222 de 1 g/L que nous savions anesthésiante (Lalonde-Robert *et al.*, 2012) et peu à non efficace pour l'euthanasie (Torreilles *et al.*, 2009). Il s'est avéré qu'il n'y avait pas de changement significatif entre les deux concentrations de MS-222 au niveau des paramètres de l'EEG et nous avons donc rassemblé tous les résultats pour analyser l'effet du MS-222 sur le SNC. Alors que nous ne pouvons plus comparer les résultats, nous avons un bassin d'animaux plus grand nous permettant d'augmenter la puissance statistique de nos résultats. Il serait intéressant de développer une méthode chirurgicale étanche afin de remettre l'amphibien à l'eau avec du matériel électrique résistant à l'eau et une méthode analgésique suffisante et affectant peu ou pas l'EEG. Nous pouvons comparer nos résultats entre les 30 premières minutes d'anesthésie et le reste de l'immersion, mais il serait intéressant d'avoir des valeurs à l'éveil comme base de comparaison.

Finalement, nous avons démontré qu'un bain d'immersion de 2 heures de tricaine méthanesulfonate de 1 g/L ou de 3 g/L, suivi de l'administration intracoelomique de 0.5 ml (240 mg/ml) de pentobarbital, induit l'arrêt cardiaque en  $3,2 \pm 1,7$  minutes. Cela pourrait

permettre la collecte de tissus en évitant les effets indésirables causés par le pentobarbital sur l'histologie. Il serait surprenant que la collecte de tissus dure 2 heures et il serait indispensable de bien surveiller le rythme cardiaque et de déterminer la dose efficace pour les besoins de l'utilisateur. Il en reste un bon compromis entre la longue euthanasie au bain de MS-222 et les effets négatifs du pentobarbital à l'histologie.

Pour résumer la discussion, l'utilisation du MS-222 en bain d'immersion chez les grenouilles *Xenopus laevis* permet une anesthésie sécuritaire et efficace avec un effet dépresseur sur le système nerveux central, suggérant une anesthésie profonde. Pour une taille de grenouilles *Xenopus laevis* similaire, l'anesthésie en bain d'immersion de 2 g/L de MS-222 est très semblable au bain de 350 mg/L d'eugénol. Les immersions par surdose de MS-222 pour l'euthanasie sont beaucoup moins efficaces en raison d'un maintien prolongé de la fonction cardiaque. Par contre, elles nous permettent de constater qu'il y a très peu d'effets sur la fréquence cardiaque et l'oxygénation des tissus même lors de l'administration de doses élevées.

## Conclusion

Au cours de nos expériences, nous avons démontré que des bains d'immersion de 20 minutes de tricaine méthanesulfonate de 1 et de 2 g/L, chez les grenouilles *Xenopus laevis*, produisent des anesthésies chirurgicales de 30 et 60 minutes respectivement. Cette anesthésie ne produit pas de changements histologiques des organes 24 heures après l'administration. Elle détient un temps de demi-vie d'élimination de 3,9 heures, suggérant la possibilité d'administrer un second bain d'immersion à la même dose le jour suivant en toute sécurité. Évidemment, il faudrait plus d'études sur l'administration journalière et sur les effets toxiques du MS-222 pour confirmer cette hypothèse.

Grâce à l'électroencéphalographie, nous avons également démontré que la tricaine méthanesulfonate utilisée à des concentrations de 1 et 3 g/L produit une dépression importante du système nerveux central après 30 minutes de bain d'immersion. De plus, nous savons maintenant que la combinaison d'un bain d'immersion de MS-222 de 1 ou 3 g/L de 2 heures et d'une injection de pentobarbital sodique intracoelomique peut permettre des manipulations terminales et une euthanasie rapide après l'injection de pentobarbital. Il serait intéressant d'utiliser l'électroencéphalographie afin d'étudier des doses euthanasiantes de MS-222 de 5 mg/kg et plus ainsi que diverses combinaisons de bain de MS-222 et de pentobarbital sodique afin de raffiner les techniques d'euthanasie des grenouilles africaine à griffes et de les rendre plus efficaces.

## Bibliographie

- Afouda, B. A., & Hoppler, S. (2009). *Xenopus* explants as an experimental model system for studying heart development. *Trends in cardiovascular medicine*, 19(7), 220–226. doi:10.1016/j.tcm.2010.01.001
- Altig, R. (1980). A convenient killing agent for amphibians. *Herpetological Review*, 11(2), 35.
- American Veterinary Medical Association. (2013). *AVMA Guidelines on Euthanasia*. Repéré à <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>. Consulté le 18 août 2013.
- Balasandaram, K., Ramalingam, K., & Selvarajan, R. (1997). Bioelectrical activity of brain in *Rana tigrina* (Daudin) in response to phosalone poisoning. *Comparative biochemistry and physiology*, 118C(2), 229–231.
- Beck, C. W., & Slack, J. M. W. (2001). An amphibian with ambition : a new role for *Xenopus* in the 21st century. *Genome Biology*, 2(10), 1–5.
- Bernstein, P. S., Digre, K. B., & Creel, D. J. (1997). Retinal toxicity associated with occupational exposure to the fish anesthetic MS-222. *American Journal of Ophthalmology*, 124(6), 843–844.
- Blisard, K. S., Fagin, K., Falivena, P., Privitera, M. D., Olejniczak, P., Harrington, D. A., Taylor, K. L., et al. (1994). Experimental seizures in the frog (*Rana pipiens*). *Epilepsy Research*, 17, 13–22.
- Brenner, G. M., Klopp, A. J., Deason, L. L., & Stevens, C. W. (1994). Analgesic potency of alpha adrenergic agents after systemic administration in amphibians. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 270(2), 540–545.
- Cakir, Y., & Strauch, S. M. (2005). Tricaine (MS-222) is a safe anesthetic compound compared to benzocaine and pentobarbital to induce anesthesia in leopard frogs (*Rana pipiens*). *Pharmacological reports*, 57, 467–474.
- Cecala, K. K., Price, S. J., & Dorcas, M. E. (2007). A comparison of the effectiveness of recommended doses of MS-222 (tricaine methanesulfonate) and Orajel® (benzocaine) for amphibian anesthesia. *Herpetological Review*, 38(1), 63–66.



- Charbonneau, R., Niel, L., Olfert, E., Von Keyserlingk, M., & Griffin, G. (2010). *Lignes directrices du CCPA sur : l'euthanasie des animaux utilisés en sciences*. Repéré à [http://www.ccac.ca/Documents/Normes/Lignes\\_directrices/Euthanasie.pdf](http://www.ccac.ca/Documents/Normes/Lignes_directrices/Euthanasie.pdf). Consulté le 18 août 2013.
- Chen, M. H., & Combs, C. A. (1999). An alternative anesthesia for amphibians: ventral application of benzocaine. *Herpetological Review*, *30*(1), 34.
- Clayton, L. A., & Gore, S. R. (2007). Amphibian emergency medicine. *The veterinary clinics of North America Exotic animal practice*, *10*, 587–620. doi:10.1016/j.cvex.2007.02.004
- Coble, D. J., Taylor, D. K., & Mook, D. M. (2011). Analgesic effects of meloxicam, morphine sulfate, flunixin meglumine, and xylazine hydrochloride in African-clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *50*(3), 355–60.
- Conroy, C. J., Papenfuss, T., Parker, J., & Hahn, N. E. (2009). Use of tricaine methanesulfonate (MS222) for euthanasia of reptile. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *48*(1), 28–32.
- Conseil canadien de protection des animaux en sciences. (2013). *Microsite des Trois R: à propos des Trois R*. Repéré à <http://3rs.ccac.ca/fr/a-propos/>. Consulté le 18 août 2013.
- Crawshaw, G. J. (1993). Amphibian medicine. Dans M. Fowler (dir.), *Zoo and Wild Animal Medicine, Current Therapy 3* (p. 131–139). Philadelphie, PA: WB Saunders Co.
- Curtis, E. K. (1990). In pursuit of palliation: Oil of cloves in the art of dentistry. *Bulletin of the History of Dentistry*, *38*(2), 9–14.
- Downes, H. (1995). Tricaine anesthesia in amphibian: a review. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, *5*(2), 11–16.
- Ekström, P. M., Short, C. E., & Geimer, T. R. (1993). Electroencephalography of detomidine-ketamine-halotane and detomidine-ketamine-isoflurane anesthetized horses during orthopedic surgery. A comparison. *Veterinary Surgery*, *22*(5), 414–418.
- Fang, G., Chen, Q., Cui, J., & Tang, Y. (2012). Electroencephalogram bands modulated by vigilance states in an anuran species: a factor analytic approach. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*, *198*, 119–127. doi:10.1007/s00359-011-0693-y

- Fang, G., Cui, J., Chen, Q., Yang, P., Song, J., & Tang, Y. (2011). Changes in electroencephalographic power spectra associated with reproductive status in frog. Dans D. Liu, H. Zhang, M. Polycarpou, C. Alippi, & H. He (dir.), *Advances in Neural Networks - ISNN 2011* (p. 139–147). Berlin, Allemagne: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Fedewa, L. A., & Lindell, A. (2005). Inhibition of growth for select gram-negative bacteria by tricaine methane sulfonate (MS-222). *Journal of herpetological medicine and surgery*, *15*(1), 13–17.
- Fish, R. E., Brown, M. J., Karas, A. Z., & Danneman, P. J. (2008). *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals* (656 p.). Londres, Angleterre: Elsevier Ltd.
- Frazier, D. T., & Narahashi, T. (1975). Tricaine (MS-222): Effects on ionic conductances of squid axon membranes. *European Journal of Pharmacology*, *33*, 313–317.
- Goulet, F., Vachon, P., & Hélie, P. (2011). Evaluation of the toxicity of eugenol at anesthetic doses in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Toxicologic Pathology*, *39*, 471–477. doi:10.1177/0192623311399785
- Goulet, Félix, Hélie, P., & 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.
- Green, C. J. (1979). Classes amphibian, reptilian and aves. Dans C. J. Green (dir.), *Animal Anaesthesia, Laboratory animal handbook 8* (p. 111–113). Londres, Angleterre: Laboratory Animals.
- Green, S. L. (2003). Postoperative analgesics in south african clawed frogs (*Xenopus laevis*) after surgical harvest of oocytes. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *53*(3), 244–247.
- Green, S. L. (2010). *The Laboratory Xenopus sp* (162 p.). Boca Raton, FL: CRC Press Taylor and Francis Group.
- Grocott, H. P., Davie, S., & Fedorow, C. (2010). Monitoring of brain function in anesthesia and intensive care. *Current Opinion in Anaesthesiology*, *23*, 759–764. doi:10.1097/ACO.0b013e3283404641

- Guenette, S. A., Beaudry, F., Marier, J. F., & Vachon, P. (2006). Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, *29*, 265–270. doi:10.1111/j.1365-2885.2006.00740.x
- Guénette, S.A., Hélie, P., Beaudry, F., & Vachon, P. (2007). Eugenol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, *34*, 164–170. doi:10.1111/j.1467-2995.2006.00316.x
- Guénette, S.A., Uhlend, F. C., Hélie, P., Beaudry, F., & Vachon, P. (2007). Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, *266*, 262–265. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.02.046
- Guénette, S. A., Beaudry, F., & Vachon, P. (2008). Anesthetic properties of propofol in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *47*(5), 35–38.
- Gunaratna, C. (2001). Drug metabolism and pharmacokinetics in drug discovery: a primer for bioanalytical chemists, Part II. *Current Separations*, *19*(3), 87–92.
- Hamamoto, D. T., & Simone, D. A. (2003). Characterization of cutaneous primary afferent fibers excited by acetic acid in a model of nociception in frogs. *Journal of Neurophysiology*, *90*, 566–577. doi:10.1152/jn.00324.2003
- Hellsten, U., Harland, R. M., Gilchrist, M. J., Hendrix, D., Jurka, J., Kapitonov, V., Ovcharenko, I., et al. (2010). The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science*, *328*, 633–636. doi:10.1126/science.1183670
- Holcapek, M., Kolárová, L., & Nobilis, M. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *391*, 59–78.
- Hudetz, A. G., Vizuete, J. A., & Pillay, S. (2011). Differential effects of isoflurane on high-frequency and low-frequency  $\gamma$  oscillations in the cerebral cortex and hippocampus in freely moving rats. *Anesthesiology*, *114*, 588–595.
- Kaplan, H. M. (1969). Anesthesia in amphibians and reptiles. *Federation proceedings*, *28*(4), 1541–1546.
- Khoka, M., Wallingford, J., Blitz, I., Conlon, F. L., Harland, R., Lau, N., Miller, A., et al. (2011). *Xenopus Community White Paper 2011*. Repéré à

[http://xenbase.org/community/static/xenopuswhitepaper/2011/XWP\\_xenbase.pdf](http://xenbase.org/community/static/xenopuswhitepaper/2011/XWP_xenbase.pdf).

Consulté le 18 août 2013.

- Kiloh, L. G., McComas, A. J., & Osselton, J. W. (1972). Technology and methodology. Dans L. G. Kiloh, A. J. McComas, & J. W. Osselton (dir.), *Clinical Electroencephalography, Third Edition* (p. 35-51). Toronto, ON: Butterworth & Co.
- KuKanich, B. (2011). Clinical interpretation of pharmacokinetic and pharmacodynamic data in zoologic companion animal species. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice*, 14(1), 1–20.
- Lafortune, M., Mitchell, M. A., & Smith, J. A. (2001). Evaluation of medetomidine, clove oil and propofol for anesthesia of Leopard frog, *Rana pipens*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 11(4), 13–18.
- Lalonde-Robert, V., Beaudry, F., & Vanchon, P. 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.
- Lalonde-Robert, V., Desgent, S., Duss, S., & Vachon, P. Electroencephalographic and physiologic changes after tricaine methanesulfonate immersion of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 51(5), 622–627.
- LaMattina, J. C., & Golan, D. E. (2008). Pharmacokinetics. Dans D. E. Golan, A. H. Tashjian Jr, E. J. Armstrong, & A. W. Armstrong (dir.), *Principles of Pharmacology, The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy, Second Edition* (p. 31–48). Baltimore, MD: Lippincott Williams and Wilkins.
- Laming, P. R. (1982). Electroencephalographic correlates of behavior in the anurans *Bufo regularis* and *Rana temporaria*. *Behavioral and neural biology*, 34(3), 296–306.
- Letcher, J. (1992). Intracelomic use of tricaine methanesulfonate for anesthesia of bullfrogs (*Rana catesbeiana*) and leopard frogs (*Rana pipiens*). *Zoo Biology*, 11, 243–251.
- Letcher, J., & Durante, R. (1995). Evaluation of use of tiletamine/zolazepam for anesthesia of bullfrogs and leopard frogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 207(1), 80–82.

- Lopes da Silva, F. (2010). EEG: Origin and Measurement. Dans C. Mulert & L. Lemieux (dir.), *EEG-fMRI* (p. 19–38). Berlin, Allemagne: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-87919-0
- Dymond, A. M., Kaechele, L. E., Jurist, J. M., & Crandall, P. H. (1970). Brain tissue reaction to some chronically implanted metals. *Journal of Neurosurgery*, *33*, 574–580.
- Machin, K. L. (1999). Amphibian pain and analgesia. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *30*(1), 2–10.
- Mitchell, M. A. (2009). Anesthetic considerations for amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine*, *18*(1), 40–49. doi:10.1053/j.jepm.2008.11.006
- Mukamel, R., & Fried, I. (2012). Human intracranial recordings and cognitive neuroscience. *Annual review of psychology*, *63*, 511–537.
- O'Donnell, J. J., O'Donnell, J. T., & Juetner, V. M. (2012). Clinical pharmacology for the primary care physician. Dans J. T. O'Donnell (dir.), *Drug Injury: Liability, Analysis and Prevention, Third Edition* (p. 558–610). Tucson, AZ: Lawyers & Judges Publishing Company, Inc.
- O'Rourke, D. P., & Shultz, T. W. (2002). Biology and diseases of amphibians. Dans J. G. Fox, L. C. Anderson, F. M. Loew, & F. W. Quimby (dir.), *Laboratory Animal Medicine* (p. 793–826). San Diego, CA: Academic Press, Elsevier Science.
- Ono, K., Baba, H., Mori, K., & Sato, K. (1980). EEG activities during kindling in frog. *The international journal of neuroscience*, *11*, 9–15.
- Otto, K. A., Cebotari, S., Höffler, H.-K., & Tudorache, I. (2012). Electroencephalographic Narcotrend index, spectral edge frequency and median power frequency as guide to anaesthetic depth for cardiac surgery in laboratory sheep. *Veterinary journal*, *191*(3), 354–359. doi:10.1016/j.tvjl.2011.02.023
- Otto, K., & Short, C. E. (1991). Electroencephalographic power spectrum analysis as a monitor of anesthetic depth in horses. *Veterinary Surgery*, *20*(5), 362–371.
- Ross, A., Guénette, S. A., Hélie, P., & Vachon, P. (2006). Cas de nécrose cutanée chez les grenouilles africaines à griffes *Xenopus laevis* suite à une application topique d'eugénol. *La Revue vétérinaire canadienne*, *47*, 1115–1117.

- Shargel, L., Wu-Pong, S., & Yu, A. B. C. (2005). *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics, Fifth Edition*. (M. Brown & C. Naglieri, dir.) (892 p.). New York, NY: The McGraw-Hill Companies Inc.
- Shumacher, J. (1996). Reptiles and amphibians. Dans J. C. Thurmon, W. J. Tranquilli, & J. G. Benson (dir.), *Lumb and Jones Veterinary Anesthesia* (p. 670–685). Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- Silva, A., Ferreira, D. A., Venancio, C., Souza, A. P., & Antunes, L. M. (2011). Performance of electroencephalogram-derived parameters in prediction of depth of anaesthesia in a rabbit model. *British Journal of Anaesthesia*, *106*(4), 540–547.
- Smith, J. M., & Stump, K. C. (2000). Isoflurane anesthesia in the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Contemporary topics in laboratory animal science*, *39*(6), 39–42.
- Spray, D. C. (1976). Pain and temperature receptors of anurans. Dans R. Llinas & W. Precht (dir.), *Neurobiology: A Handbook* (p. 605–627). Berlin: Springer-Verlag.
- Stetter, M. D. (2001). Fish and amphibian anesthesia. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice.*, *4*(1), 69–82.
- Stetter, M. D., Raphael, B., Indiviglio, F., & Cook, R. A. (1996). Isoflurane anesthesia in amphibians: comparison of five application methods. *1996 Proceedings American Association of Zoo Veterinarians* (p. 255–257).
- Stevens, C.W., Maciver, D. N., & Newman, L. C. (2001). Testing and comparison of non-opioid analgesics in amphibians. *Contemporary topics in laboratory animal science*, *40*(4), 23–27.
- Stevens, Craig W. (2004). Opioid research in amphibians: an alternative pain model yielding insights on the evolution of opioid receptors. *Brain Research Reviews*, *46*, 204–215. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.07.003
- Tallgren, P., Vanhatalo, S., Kaila, K., & Voipio, J. (2005). Evaluation of commercially available electrodes and gels for recording of slow EEG potentials. *Clinical neurophysiology*, *116*, 799–806. doi:10.1016/j.clinph.2004.10.001
- Thurmon, J. C., & Short, C. E. (2007). History and overview of veterinary anesthesia. Dans W. J. Tranquilli, J. C. Thurmon, & K. A. Grimm (dir.), *Veterinary Anaesthesia and Analgesia, Fourth Edition* (p. 3–6). Ames, IA: Blackwell Publishing.

- Tonner, P. H., & Bein, B. (2006). Classic electroencephalographic parameters: Median frequency, spectral edge frequency etc. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 20(1), 147–159.
- Torreilles, S. L., McClure, D. E., & 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.
- Tozer, T. M., & Rowland, M. (2006). Assessment of AUC. Dans T. N. Tozer & M. Rowland (dir.), *Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, The Quantitative Basis of Drug Therapy* (p. 275–277). Baltimore, MD: Lippincott Williams and Wilkins.
- Vachon, P., Dupras, J., Prout, R., & Blais, D. (1999). EEG recordings in anesthetized rabbits: comparison of ketamine-midazolam and telazol with or without xylazine. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 38(3), 57–61.
- Vogelnest, L. (1994a). Myiasis in a green tree frog *Litoria caerulea*. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 4(1), 4.
- Vogelnest, L. (1994b). Transponder implants for frog identification. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 4(1), 4.
- Von Esse, F. V., & Wright, K. M. (1974). Effect of intracoelomic propofol in White's tree frog, *Pelodytes caerulea*. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 9, 7-8.
- Wass, J. A., & Kaplan, H. M. (1974). Methoxyflurane anesthesia for *Rana pipens*. *Laboratory Animal Science*, 24(4), 669–671.
- Wayson, K. A., Downes, H., Lynn, R. K., & Gerber, N. (1976). Studies on the comparative pharmacology and selective toxicity of tricaine methanesulfonate: Metabolism as a basis of the selective toxicity in poikilotherms. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 198(3), 695–708.
- Wright, K. M. (1994). Amputation of the tail of a two-toed amphiuma, *Amphiuma means*. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 4(1), 5.
- Wright, K. M. (1996). Amphibian husbandry and medicine. Dans D. R. Mader (dir.), *Reptile Medicine and Husbandry* (p. 436–458). Philadelphie, PA: WB Saunders Co.

- Wright, K. M. (2001). Restraint techniques and euthanasia. Dans K. M. Wright & B. R. Whitaker (dir.), *Amphibian Medicine and Captive Husbandry* (p. 111–122). Malabar, FL: Krieger Publishing Company.
- Yuan, J., Chen, Y., & Hirsch, E. (2012). Intracranial electrodes in the presurgical evaluation of epilepsy. *Neurological sciences*, *33*, 723–729.



