

# REFERENTIEL POUR LA MISE EN RESEAU

## DES CENTRES DE TRANSGENESE

### CONDITIONS MINIMALES REQUISES POUR PERMETTRE L'ECHANGE DE RONGEURS GENETIQUEMENT MODIFIES

La mise en commun des lignées de souris transgéniques est devenue une nécessité qui demande une organisation en réseau au niveau national et international. Pour cela, un engagement est indispensable dans la mise en place des conditions minimales requises concernant les statuts sanitaires des animaleries.

Ce document de référence reprend les grandes lignes des « Recommandations pour la mise en place et le fonctionnement d'un établissement d'expérimentation animale pour rongeurs et lagomorphes » établi par un groupe de travail en juillet 2005 à la demande de l'Université Paris VII.

Ce document est un référentiel de base, l'envoi de souris génétiquement modifiées sera accompagné d'une fiche d'identité précisant les spécificités de chaque centre.

#### A) RAPPELS ET DEFINITIONS

##### 1) Statuts microbiologiques et statuts sanitaires

Il existe cinq classes de statuts microbiologiques des animaux ; elles sont définies dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Définition des statuts microbiologiques

| STATUTS<br>MICROBIOLOGIQUES   | DEFINITIONS   |
|---|---|
| <b>1-Holoxénique</b>  | Animaux « sains » hébergeant une flore bactérienne dont on ne peut pas garantir l'absence d'agents pathogènes et opportunistes  |
| <b>2-Hétéroxénique SPF</b><br>(Specific Pathogen Free)<br><b>EOPS</b> (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques)<br><b>IOPS</b> (Indemne d'Organismes Pathogènes Spécifiques) | Animaux obtenus par césarienne aseptique ou transfert d'embryons qui sont indemnes d'agents pathogènes majeurs pour l'espèce (liste FELASA, Federation of European Laboratory Animal Science Associations, <a href="http://www.felasa.org">www.felasa.org</a> ) |
| <b>3-Hétéroxénique SOPF</b><br>(Specific Opportunistic and Pathogen Free)   | Animaux obtenus par césarienne aseptique ou transfert d'embryons qui sont indemnes d'agents pathogènes majeurs et de certains microorganismes opportunistes à préciser  |
| <b>4- Gnotoxénique</b>  | Animaux obtenus par césarienne aseptique ou transfert d'embryons inoculés par un ou plusieurs microorganismes connus  |
| <b>5- Axénique ou germ-free</b>   | Animaux obtenus par césarienne aseptique, indemnes de microorganismes détectables   |

Le statut microbiologique des animaux est maintenu grâce à des conditions d'environnement et d'hébergement spécifiques. Il est validé par des contrôles sanitaires spécifiques qui permettent d'attester, à un instant donné, de la situation microbiologique de la population considérée.

Tableau 2 : Statuts sanitaires et règles de contrôles

| <b>STATUTS SANITAIRES</b> | <b>HEBERGEMENT</b>   | <b>CONTROLES SANITAIRES</b>  |
|---------------------------|--|--|
| <b>1-Holoxénique</b>      | Hébergement conventionnel  | Contrôles au-moins une fois par an de l'absence de pathogènes majeurs  |
| <b>2-SPF</b>              | Zone protégée  | Contrôles réguliers (une fois par trimestre) de l'absence de pathogènes majeurs (liste FELASA)   |
| <b>3- SOPF</b>            | En isolateur stérile ou cages individuelles ventilées (IVC) avec ouverture sous hotte à flux laminaire ou autre confinement de ce type | Contrôles réguliers (une fois par trimestre) de l'absence de pathogènes majeurs et des opportunistes indésirables dont la liste est à indiquer                                       |
| <b>4-Gnotoxénique</b>     | Isolateur en condition stérile   | Ces animaux maintenus dans des conditions très spécifiques ne sont pas destinés à être échangés avec des laboratoires extérieurs. Les analyses sont effectuées pour chaque isolateur |
| <b>5- Axénique</b>        | Isolateur en condition stérile   | Ces animaux maintenus dans des conditions très spécifiques ne sont pas destinés à être échangés avec des laboratoires extérieurs. Les analyses sont effectuées pour chaque isolateur |

## **B] EXIGENCES DU TRANSFERT**

Lors du **transfert d'animaux transgéniques**, la **réglementation concernant les OGM** s'ajoute à **celle concernant le transport des animaux**. Le principe essentiel est d'assurer une continuité du niveau de confinement entre l'établissement d'accueil et l'établissement d'origine, y compris au cours du transfert pour éviter la rupture de confinement.

### **a) L'agrément des locaux**

Les différents types de pièces à prévoir dans une animalerie de production ou d'accueil d'animaux transgéniques sont:

- Des locaux de départ et d'arrivée
- Des pièces d'hébergements séparées pour chaque espèce animale
- Des pièces d'hébergement confiné pour les animaux transgéniques afin d'éviter toute évacion

- Un local isolé de quarantaine ou une quarantaine extérieure à l'unité
- Une salle d'opération ou d'expérimentation ou d'autopsie séparée des pièces de stabulation
- Des locaux séparés pour l'entreposage et la conservation de la nourriture et des litières
- Un local séparé pour entreposer les cages propres et le matériel nécessaire à l'animalerie
- Un local de nettoyage et de lavage

Ces pièces seront bien sûr dotées de toutes les conditions de revêtement et d'entretien relatives à ce type d'infrastructure.

#### **b) le formulaire-type**

***Un accord de transfert de matériel biologique (MTA) devra être établi entre les partenaires pour chaque transfert de souris transgénique.***

Le formulaire devra définir

- les informations sur la lignée : nom international, informations pour le contrôle génétique, l'état sanitaire d'origine, et autres informations jugées utiles pour l'élevage de la lignée
- les conditions supplémentaires si nécessaires (par exemple la prise en charge, par l'un ou l'autre des partenaires, de tests d'opportunistes)

#### **c) la demande d'agrément d'OGM**

***Tout utilisateur doit faire une demande préalable d'agrément auprès de la Commission de Génie Génétique (CGG) pour la création, la détention et l'utilisation d'OGM.*** Son obtention est soumise à la description des locaux de confinement conforme à la classe de risques envisagée. Cet agrément, dont la validité est de 4 à 5 ans, définit le classement de risque et les exigences de confinement. ***Le niveau de confinement peut être différent du classement de l'OGM.***

Le dossier de demande d'agrément peut-être téléchargé sur le site <http://www.recherche.gouv.fr/commiss/genetique/principe/principe.htm>.

***Le transporteur devra également faire une demande d'agrément***

#### **d) la fiche d'identité**

Une fiche d'identité est établie pour chacun des centres de transgénèse susceptibles de faire partie du réseau. Elle précisera certains points, notamment :

- les contrôles sanitaires effectués (méthode, fréquence, laboratoires d'analyse, certificat sanitaire type) et le mode d'hébergement
- la liste des opportunistes NON acceptés
- les transporteurs utilisés
- les procédures de quarantaine
- les caractéristiques zootechniques et physiologiques particulières

# C] CONTROLES SANITAIRES

## Rappel de quelques définitions

Une population est un ensemble homogène pour son statut sanitaire.

Une unité microbiologique est une structure dans laquelle on peut considérer que tous les animaux possèdent le même statut sanitaire.

La prévalence est le pourcentage d'animaux porteurs d'un pathogène donné dans une population.

L'incidence est le pourcentage de nouveaux cas.

Une épizootie affecte brutalement dans une unité un grand nombre d'animaux à la fois.

Une enzootie sévit en permanence dans une unité sur une population animale.

Un agent opportuniste est un agent qui devient pathogène dans certaines circonstances (immunodépression, par exemple).

## 1) Organisation des tests

### a- Choix des animaux à tester

Les animaux à analyser doivent être représentatifs de l'unité microbiologique à tester. Il peut s'agir d'animaux prélevés au hasard dans la population. Toute modification génétique étant susceptible d'altérer la réponse immunitaire de l'individu, il est préférable d'utiliser des souris de génotype sauvage au sein des portées d'animaux génétiquement modifiés ou de recourir à des sentinelles. L'utilisation de sentinelles présente l'avantage d'éviter le sacrifice d'animaux précieux.

Les **animaux sentinelles** devront avoir un statut sanitaire connu (SPF voire SOPF) avant leur introduction dans l'animalerie. Pour pouvoir réaliser des tests sérologiques, ils devront être âgés au minimum de 6 à 8 semaines et ne pas être immunodéprimés (Nudes, SCID, certaines lignées transgéniques ou KO). Ils seront hébergés au minimum 6 voire 9 semaines dans l'unité à tester, mis en contact direct avec des animaux de l'unité et/ou en contact indirect (litière souillée, aliment et eau d'autres cages) de préférence en bas de portoirs. A noter que la mise en contact indirecte est inappropriée à la détection des agents faiblement résistants dans l'environnement (Helicobacter, Sendai virus..).

### b- Population à tester selon le type d'hébergement.

**Hébergement conventionnel (> 100 animaux, en cages ouvertes)** : on applique la formule ILAR : taille de l'échantillon à prélever =  $[\log 0,05 / \log N]$  (où 0.05 correspond à un intervalle de confiance de 95% et N au % d'animaux non infectés). Cette formule repose sur les hypothèses que les 2 sexes sont infectés de la même façon, que la population est > 100 animaux et que l'agent infectieux est normalement distribué.

**A titre d'exemple**, pour détecter un agent infectieux qui serait présent dans l'unité à tester avec une prévalence de 30%, le nombre d'animaux à tester serait de  $[\log 0.05 / \log (1-0.3)]$ , soit, environ 8-10 animaux. Si 10 animaux à tester sont prélevés au hasard dans la population, on choisira parmi les individus représentatifs : 2 animaux sevrés (âgés de 3 semaines) pour la bactériologie et la parasitologie, 4 jeunes adultes (entre 10 et 14 semaines) pour la bactériologie, la parasitologie et la virologie et 4 anciens reproducteurs âgés de plus de 6 mois pour la virologie. Il faut veiller à ne pas prendre des animaux trop âgés car le taux d'anticorps non spécifiques augmente avec l'âge.

**Hébergement en portoirs ventilés ou dans des cages à couvercles filtrants :** la formule de ILAR n'est plus applicable car chaque cage est une unité microbiologique distincte. *Dans ce cas, un programme de monitoring avec des sentinelles semblent être le plus approprié.* Sur les grands échantillons, il faut compenser le faible nombre de sentinelles testées en les mettant en contact indirect avec le plus grand nombre possible de cages (« dirty bedding »). Sur les petits échantillons, il est préférable de tester une sentinelle par cage.

### **Petit nombre d'animaux hébergés en isolateurs ou en armoires ventilées**

Du fait de la taille réduite de la population à tester dans le cas des hébergements en isolateurs ou en armoires ventilées (aspects statistiques contradictoires) et du manque de place, il est recommandé d'introduire 3 à 5 sentinelles et de compenser le faible nombre de sentinelles testées en les mettant en contact (direct et/ou indirect) avec le plus grand nombre possible de cages.

## **2) Méthodes de dépistage**

### a-Sérologie

La technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est la plus utilisée car la plus sensible. Elle permet de cribler de grandes populations.

#### **Sensibilité et spécificité des tests sérologiques :**

En général, l'ELISA et l'IFA (Indirect Fluorescence Assay) sont des tests plus sensibles mais moins spécifiques que le test HAI (Hemagglutination Assay Inhibition). Des faux négatifs sont possibles si l'animal testé est immunodéficient, trop jeune ou en période d'incubation au moment du test. D'autres techniques comme le Western blot sont sensibles et spécifiques mais non utilisables en routine et coûteux.

### b- Cultures bactériennes.

Elles consistent en l'isolement des microorganismes par culture dans des milieux non sélectifs et sélectifs. Les micro-organismes sont ensuite identifiés d'après leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques.

**Limite des cultures bactériennes:** certains kits type « galeries API » destinés aux cultures bactériennes humaines ne permettent pas d'identifier correctement les souches bactériennes des animaux de laboratoire, telles que *Pasteurella* et *Citrobacter rodentium*. Certaines bactéries sont très difficiles à cultiver, telles que *Clostridium piliforme*, *Helicobacter sp*, *Streptobacillus moniliformis*.

### c - Examens microscopiques.

Ils comportent l'examen du pelage sous une loupe pour la recherche des ectoparasites, l'examen du contenu du colon, de l'intestin grêle ou du cæcum avec technique de flottaison pour la recherche des endoparasites. Il est nécessaire de croiser les différentes techniques pour les nématodes du fait de leur cycle de vie (adultes, larves et œufs) et de différents sites de colonisation chez leur hôte.

**Limites des examens microscopiques :** les animaux âgés sont moins sensibles aux endoparasites. Il existe un risque de passer à côté d'une infestation du fait du cycle de vie de l'endoparasite et en fonction du taux de contamination.

### d- Autopsies et analyses histologiques.

L'autopsie des animaux testés, de même que celle des animaux malades doit être systématique. Elle permet de détecter les lésions importantes. Il est à noter que les lésions sont

souvent plus facilement visibles chez les animaux immunodéficients que chez les animaux immunocompétents. Il est important de procéder à des colorations spécifiques (ex, Steiner pour la détection de *Helicobacter* ou *Clostridium piliforme*).

**Limites de l'autopsie et des analyses histologiques :** beaucoup d'agents pathogènes des animaux de laboratoire sont cliniquement silencieux et causent peu ou pas de lésions visibles (ex *Mouse parvovirus*). Un certain nombre d'agents pathogènes ne sont pas présents dans les lésions qu'ils ont induites (ex, *Citrobacter freundii*). Certaines colorations spécifiques ne permettent pas d'identifier la sous-espèce et sont lourdes à mettre en oeuvre (par ex, *Helicobacter* et coloration de Steiner)

#### e- Techniques de biologie moléculaire.

Elles comportent les techniques de PCR, RT-PCR, PCR quantitative et micro-arrays. Elles sont très intéressantes pour le matériel biologique. La PCR est la seule méthode pour identifier les sous-espèces d'*Helicobacter* (*hepaticus*, *bilis* et *typhlonicus*). Elle permet de déterminer si un animal immunocompétent est excréteur. Il est à noter que les animaux immunodéficients infectés sont des excréteurs chroniques. La PCR est à utiliser avec les méthodes traditionnelles pour confirmer ou infirmer des résultats positifs (Ex : *Parvovirus*, PCR sur noeuds lymphatiques mésentériques pour confirmer un résultat positif en ELISA). Enfin la PCR permet de tester directement le matériel (cages) et l'environnement (filtres).

**Limites des techniques de biologie moléculaire :** Ces techniques sont difficilement applicables en routine pour tester un grand nombre d'animaux. Il faut connaître les tissus cibles pour chaque agent pathogène recherché. Attention aux agents pathogènes qui peuvent rester à l'état latent dans l'organisme (excrétions intermittentes).

**Faux négatifs :** on peut observer des résultats faussement négatifs si la qualité des échantillons n'est pas bonne (rendement insuffisant dans l'extraction des acides nucléiques, dégradation des acides nucléiques, présence de contaminants inhibant la réaction PCR), si la méthodologie utilisée n'est pas correcte (amorces oligonucléotidiques choisies dans une séquence potentiellement délétée) ou bien encore si le tissu analysé n'est pas la bonne cible.

**Faux positifs :** on peut observer des résultats faussement positifs en cas de contamination des échantillons par d'autres échantillons ou par des produits d'amplification obtenus antérieurement.

### **3) Périodicité des contrôles sanitaires**

Un rythme de 4 fois par an (tous les 3 mois) est préconisé. Il est à noter que *pour les échanges d'animaux entre les établissements d'élevage ou de recherche, un bilan sanitaire de moins de 3 mois est généralement demandé par le destinataire*. Cette fréquence peut être modulée selon le fonctionnement de la structure ou en fonction des pathogènes. En cas d'introduction fréquente d'animaux ou de matériel biologique dans l'unité, il est recommandé de tester 3 à 5 animaux par mois.

*La liste des agents pathogènes à rechercher ainsi que la fréquence des analyses doivent s'appuyer sur les recommandations FELASA. Il s'agit bien de recommandations sur un ensemble d'agents à dépister, il y aura toujours de nouveaux agents pathogènes murins.*

Il incombe à chaque laboratoire de *définir ses objectifs en matière d'interférences* de certains agents pathogènes avec la recherche. L'attitude à adopter face à la présence confirmée d'un agent indésirable sera différente selon l'agent pathogène, le mode d'hébergement des animaux et les expériences menées.

Il faut donc une personne compétente capable de mettre en oeuvre, de comprendre et d'interpréter les contrôles sanitaires.

#### 4) Exigences concernant les laboratoires d'analyses

Il peut exister une importante variabilité des résultats entre les différents laboratoires diagnostiques. Afin de limiter ce risque, il est souhaitable que l'établissement hébergeant des animaux s'assure de la démarche qualité des prestataires qui effectuent les tests. Si le prestataire n'est pas certifié (ISO série 9000 ou EN 45001), il est judicieux de s'assurer qu'il suit au mieux les recommandations FELASA. La démarche qualité implique au minimum des procédures écrites détaillées et accessibles (BPL).

Il est nécessaire que l'établissement hébergeant des animaux et qui réalise lui-même un contrôle sanitaire s'assure de la démarche qualité (BPL, normes ISO etc.). Les procédures mises en place par le laboratoire de vérification d'un résultat positif sont internes et doivent répondre à une charte de bonne pratique de laboratoire.

#### 5) Conduite à tenir en cas de contamination

La conduite à tenir est fonction :

- de la valeur des animaux contaminés (et/ou des protocoles)
- de la gravité de l'agent infectieux (la problématique étant plus complexe en cas de polyinfection)

a) tous les animaux contaminés et/ou exposés doivent être immédiatement isolés (isolateur, pièce isolée ou quarantaine) et les personnes concernées doivent être prévenues pour adopter le confinement approprié.

b) le traitement ou l'euthanasie doivent être décidés rapidement pour limiter la propagation. Le traitement, s'il existe, ne doit être entrepris qu'avec un espoir de réussite raisonnable : privilégier les traitements individuels, par injection, sur une population de jeunes adultes non reproducteurs (arrêter la reproduction et réduire les effectifs avant le traitement).

c) il est possible d'éradiquer les infections virales non persistantes (MHV, Sendai, ...) par un schéma d'élevage approprié (sélectionner et isoler sur 2 générations des individus séronégatifs), mais la procédure est lourde.

d) il est possible d'éradiquer les infections et parasitoses dans un effectif par hystérectomie aseptique ou par transplantation embryonnaire pour dériver un élevage sain.

### DJ INTRODUCTION D'ANIMAUX ET DE MATERIEL BIOLOGIQUE, REGLES DE QUARANTAINE

L'introduction d'animaux vivants ou de matériel biologique constitue un risque de contamination important qu'il est nécessaire de maîtriser.

#### 1) Introduction des animaux.

Il est indispensable de prévoir une période d'isolement et d'évaluation dans une structure de quarantaine (ex : isolateur, pièce indépendante etc...) avant d'accepter et d'introduire les animaux dans l'animalerie. Trois cas de figure peuvent se présenter :

- **Les animaux introduits sont de statut sanitaire connu** : La « quarantaine » peut alors être utilisée plus comme une période d'acclimatation des animaux.

- **Les animaux proviennent d'un établissement maintenant les animaux sous barrière et pouvant fournir un bilan satisfaisant.** Un « bon » contrôle sanitaire doit présenter les informations suivantes : i) Historique sur les 18 derniers mois, ii) agents pathogènes testés, iii) méthodologie

utilisée, iv) Fréquence, v) nombre d'animaux testés, vi) traitements éventuels. Quoiqu'il en soit, un contrôle du statut sanitaire pendant la période de quarantaine est préconisé car il assure un niveau de sécurité supérieur avant l'introduction des animaux en zone animalerie.

- **Les animaux de statut sanitaire inconnu** sont évidemment à confiner et à décontaminer.

Les animaux doivent être *mis en quarantaine et isolés de manière très stricte*. Un contrôle sanitaire doit être réalisé avant leur introduction dans la zone d'hébergement ou d'expérimentation. On peut utiliser le système de sentinelles (voir § C1a). *Ils ne seront introduits que si le résultat du contrôle est satisfaisant. Dans le cas contraire, une dérivation par césarienne ou par transfert d'embryons sera nécessaire pour leur introduction.*

## **2) Introduction de matériel biologique.**

L'utilisation de matériel biologique (cellules ES, fibroblastes, sperme, sérum, lignées cellulaires, tumeurs, hybridomes,...) peut conduire à l'introduction involontaire d'agents pathogènes. Il est recommandé de considérer le matériel biologique comme contaminé et de mener les expérimentations en strict confinement jusqu'à ce que le matériel biologique soit testé (production d'anticorps ou PCR) et trouvé libre de toute contamination.

## **3) Introduction de matériel congelé**

Pour le **transfert de matériel congelé**, le producteur devra indiquer la méthodologie de redérivation et le pourcentage de reviviscence obtenu.

---

24 janvier 2006

*Ce document a été réalisé grâce à la participation de Yara Barreira (IFR 31, Toulouse), Claire Benetollo (UCBL, Lyon), Brigitte Bouchard (DSV, CNRS), Jean-Pierre de Cavel (Institut Pasteur, Lille), Karim Chebli (IGM, Montpellier), Marie-Pierre Dubrulle (Réseau National des Génopoles), Armelle van Es (ICS, Strasbourg), Anne Gillet (CIML, Marseille), Anne-Françoise Goguel (DAPS, Inserm), Delphine Grezel (ENVL, AFSTAL, Lyon), Yann Herault (CDTA, Orléans), François Lachappelle (BEA, Inserm), Patrick Lechopier (Centre INRA de Tours-Nouzilly), Jacques Yuan Li (UCBL, Lyon), Marie Malissen (CIML, Marseille), Michèle Pauchard (Institut Cochin, Paris), Alain Puget (IPBS, Toulouse), Véronique Queste, (PBES, Lyon), Brigitte Rault (CHU Pitié Salpêtrière, Paris), Jean-Pierre Regnault (CDTA, Orléans), Jean-Louis Thoumas (PBES, Lyon), Abdelmalek Ziadi (CDTA, Orléans).*