

PROCÉDURE DE RÉGIE ET D'OPÉRATION STANDARD

GENOTYPAGE CHEZ LA SOURIS

OBJECTIF : Décrire une procédure normalisée de fonctionnement pour l'exécution du génotypage chez la souris pour extraire l'ADN.

APPLICATION : Cette procédure doit être appliquée par tous les employés de la DA ainsi que les chercheurs, les étudiants et les visiteurs.

RESPONSABLES : Techniciens-animaliers,
Vétérinaire clinicien
Chef des services vétérinaires.

GÉNÉRALITÉS :

Il peut être nécessaire d'identifier ou de confirmer le génotype d'une souris modifiée génétiquement pour éliminer tout risque de contamination génétique d'une colonie et pour en contrôler la qualité génique. Cela se fait en analysant l'ADN d'un prélèvement effectué sur l'animal.

Lorsque le génotypage d'un animal s'avère nécessaire, *c'est la méthode causant le moins de douleur, de détresse et d'inconfort qui devrait, dans la mesure du possible, être utilisée*_ CCPA, lignes directrices : les soins et la gestion des animaux en science (2017), et privilégiée.

Il est de plus recommandé, lorsque cela est possible, de privilégier une méthode de prélèvement d'ADN pouvant également servir à identifier les animaux afin de minimiser le nombre de procédures subit par l'animal et potentiellement la douleur et la détresse vécues_CCPA, lignes directrices : Souris.

Autre que la traditionnelle coupe de queue, certaines méthodes d'identification moins invasives, comme le poinçonnage d'oreille, ou les prélèvements de cellules buccales, de follicules pileux et de boulettes fécales, peuvent fournir des échantillons adéquats. Par contre, mis à part le poinçonnage d'oreille, il faut noter que ces méthodes moins invasives peuvent ne pas fournir suffisamment d'ADN pour la technique d'analyse à utiliser (Southern blot vs PCR) et que ces méthodes de prélèvement sont plus sujettes aux contaminations croisées.

Malgré cela, éthiquement parlant, tout devrait être fait pour sélectionner la méthode de prélèvement la moins invasive possible.

TECHNIQUES DE GENOTYPAGE :

Il est important, pour garantir le bien-être des animaux tout en s'assurant d'obtenir des résultats scientifiques valides, et d'utiliser efficacement le temps et les ressources, de choisir une méthode d'analyse des échantillons prélevés qui convienne aux exigences de l'étude tout en veillant à mettre en place des mesures pour obtenir des résultats optimaux qui réduisent la nécessité d'un ré-échantillonnage (Bonaparte et coll., 2013).

GENOTYPAGE CHEZ LA SOURIS

Le succès de la technique sélectionnée dépend d'éléments essentiels, comme la bonne purification de l'ADN et le suivi rigoureux de mesures visant à empêcher la contamination entre les échantillons et la dégradation des échantillons d'ADN (Bonaparte et coll., 2013).

Deux techniques biomoléculaires sont principalement utilisées pour examiner et comparer la séquence d'ADN de l'animal échantillonné, le *PCR* et le *Southern blot*.

PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) :

Le PCR devrait être utilisé comme technique de présélection des individus et de technique de base pour effectuer le génotypage de routine des animaux d'une colonie de reproduction. Nécessitant peu d'ADN, des échantillons de fèces, de salive, de poil, de sang ou le tissu provenant d'un poinçonnage d'oreille peuvent être utilisés.

A noter qu'il pourrait s'avérer difficile d'optimiser un PCR pour déterminer si la recombinaison homologue s'est bien produite dans le génome des animaux génétiquement modifiés compte tenu du manque de témoins positifs _CCPA, lignes directrices : Souris.

SOUTHERN BLOT (TRANSFERT SOUTHERN) :

Le Southern blot demeure la technique de choix pour identifier avec certitude les insertions géniques ciblées et déterminer s'il y a eu réarrangements lors de l'insertion du transgène ou du ciblage génique (Bonaparte et coll., 2013).

Il peut également servir à identifier la structure génétique entourant les pièges à gènes ou les sites d'insertion d'un transposon.

En raison de la grande quantité de tissu nécessaire comparativement à ce qui est nécessaire pour le PCR, l'analyse par Southern ne devrait être utilisée que pour le génotypage des animaux fondateurs d'une colonie.

DESCRIPTION :

1. BOULETTES FECALES :

Le prélèvement de boulettes fécales est une technique facile et non invasive d'obtenir du matériel (cellules épithéliales ayant desquamé dans la lumière intestinale) pour effectuer un PCR (Chen & al., 2012).

Un technique d'identification des animaux doit être utilisée (ex : boucle d'oreille).

D'une façon générale, il suffit de manipuler l'animal pour prélever les échantillons d'excréments, par contre, si cela s'avère non concluant, placer la souris dans une nouvelle cage vide et attendre 1 à 2 minutes devrait être efficace.

Il est à noter que la défécation spontanée n'est observée que chez les rongeurs âgés de plus de 2 semaines.

Pour améliorer l'efficacité de la technique, on conseille de prélever plus d'une boulette fécale par animal et d'analyser les échantillons recueillis dans les 24 heures qui suivent.

NB : L'extraction de l'ADN dans les matières fécales n'est connu comme fiable que pour seulement quelques constructions génétiques (Hamann et coll., 2010); malgré cela le CCPA encourage les chercheurs à essayer cette méthode de génotypage et à publier leurs résultats pour établir la fiabilité de la méthode et en promouvoir l'utilisation _CCPA, lignes directrices : Souris.

GENOTYPAGE CHEZ LA SOURIS

GENOTYPAGE CHEZ LA SOURIS

2. CELLULES BUCCALES :

Le prélèvement d'échantillons de salive ou de cellules buccales est aussi une méthode simple et peu invasive d'obtenir du matériel génétique (par pipette, frottis buccal, coton-tige) pour le génotypage par PCR.

L'ouverture forcée de la bouche pour le prélèvement d'un échantillon peut être considérée stressante pour l'animal et nécessite un peu d'expérience tout comme une contention adéquate. Notez que des cas d'autotraumatisme par morsure accidentelle de la langue sont rapportés.

De plus, ne pas oublier que les échantillons prélevés de souriceaux non sevrés peut être contaminés par de l'ADN maternel provenant de cellules épithéliales des glandes mammaires.

3. FOLLICULES PILEUX :

Les poils peuvent être prélevés sur le ventre de l'animal à l'aide de pinces et avec une contention minimale.

Bien que peu invasive, cette méthode est peu utilisée à cause des risques de contamination qui y sont attachés. En effet, les échantillons de poils étant souvent chargés électrostatiquement collent aux instruments.

Malgré tout, cette méthode de prélèvement reste suggérée pour recueillir un échantillonnage de confirmation.

On la recommande également lorsque d'autres procédures, plus invasives, représentent un risque pour la santé des souris (i.e. animaux immunosupprimés ou souffrant de coagulopathie)

4. SANG :

Le prélèvement sanguin n'est pas utilisé fréquemment pour le génotypage des souris mais le petit échantillon obtenu convient lorsque les animaux doivent être regroupés selon un phénotype cellulaire sanguin.

Noter que le prélèvement sanguin chez la souris âgée de moins de 2 semaines devrait être évité compte tenu du risque de développement d'un choc hypovolémique chez elles (Robinson et coll., 2003).

5. BIOPSIE OU POINÇONNAGE D'OREILLE :

La biopsie de l'oreille provoque moins d'inconfort que celle de la queue parce qu'elle ne touche pas un tissu osseux.

De plus, il est généralement plus facile d'obtenir de bons résultats à partir d'un prélèvement auriculaire parce qu'il contient plus d'ADN que les tissus prélevés sur la queue, ou sur une autre partie du corps (Robinson & coll, 2003).

Noter que le tissu prélevé sur l'oreille pour le génotypage peut également être utilisé pour l'identification des animaux.

Malheureusement, la méthode employée peut causer de la douleur et de l'inconfort chez l'animal, peut être la cause de saignement si la biopsie n'est pas bien effectuée.

Elle ne devrait pas être utilisée chez les souriceaux de moins de 2 semaines d'âge à cause de la petite taille de leurs oreilles.

GENOTYPAGE CHEZ LA SOURIS

6. COUPE DE QUEUE :

L'amputation du bout de la queue chez la souris est une procédure très douloureuse. Elle ne devrait donc pas être employée si une autre méthode de prélèvement peut donner les résultats recherchés.

Pour être éthiquement acceptable, elle doit être faite selon des normes établies afin de réduire au maximum l'inconfort et augmenter le raffinement.

Matériel nécessaire :

Souris de 14-17 jours :

- Hotte
- 1 piqué
- Gazes 4 X 4
- Seringues 1ml et aiguilles 25G
- Solution de Peroxigard
- Bupivacaïne 0.5%
- Alcool 70%
- Tube de contention pour souris
- Ciseau Iris bien tranchant et pince
- Ependorfs, support à tubes épendorfs, glacière et glace
- Crayon permanent pour identifier les tubes épendorfs
- médaille d'oreille
- Feuille et crayon pour noter la coupe de queue

Souris plus âgées, ou deuxième coupe de queue :

- Hotte
- 1 piqué
- Gazes 4 X 4
- Seringues 1ml et aiguilles
- Solution de Peroxigard
- Bupivacaïne 0.5%
- Alcool 70%
- Appareil anesthésie et boîte d'induction :
 - Isoflurane, et source d'oxygène
 - Tube corrugué et masque
 - Système d'évacuation des gaz
- Ciseau Iris bien tranchant et pince
- Ependorfs, support à tubes épendorfs, glacière et glace
- Crayon permanent pour identifier les tubes épendorfs
 - Feuille et crayon pour noter la coupe de queue
 - médaille d'oreille

6.1. PROCEDURE

6.1.1. Première coupe de queue :

La coupe de queue d'une souris âgée de 14 à 17 jours n'ayant jamais eu de coupe auparavant, peut être effectuée sans anesthésie générale. On doit éviter autant que possible les coupes effectuées **au-delà de 28 jours**. Après cet âge **il est nécessaire d'anesthésier l'animal**.

GENOTYPAGE CHEZ LA SOURIS

- Placer le matériel nécessaire dans la hotte avant d'aller chercher les souris.
- Aller chercher la cage contenant la/les souris à faire.
- Vaporiser la cage avec du Peroxiguard dilué avant de déposer celle-ci sur le piqué, sous la hotte.
- Prendre la souris et vérifier son identification.
- Inscrire le numéro de la souris sur le dessus du tube Ependorf à l'aide du marqueur permanent.
- Insérer la souris dans le tube de contention.
- Couper le bout de la queue avec le ciseau à Iris (2-3 mm pour PCR, max 5 mm pour Southern).
- Pincer le bout de queue pour effectuer une pression et ainsi réduire le saignement.
- Déposer une goutte de bupivacaïne sur le bout de la queue. Cette dernière a pour but de réduire la douleur et diminuer le saignement. (Dose maximale 2 mg/kg)
- Récupérer le bout de queue avec la pince et déposez-le dans le tube.
- Mettre le tube Ependorf dans la glace pour éviter la dégradation prématurée de l'ADN.
- Identifier la souris à l'aide d'une boucle d'oreille numérotée si ce n'est pas déjà fait.
- Remettre la souris dans sa cage.
- Désinfecter les ciseaux à Iris avec de l'alcool et une gaze propre.
- Vérifier l'état des animaux.
- Prendre la prochaine souris.

6.1.2. Procédure pour une deuxième coupe ou dans le cas d'une souris plus âgée :

- Suivre les 5 premières étapes décrites plus haut.
- Mettre la/les souris dans la boîte à anesthésie.
- Régler le débit d'O₂ à environ 500 ml et d'isoflurane à 2-3%.
- Quand la souris est anesthésiée, sortir celle-ci de la boîte et maintenir l'anesthésie avec le tube corragué. Pincer la patte pour vérifier le réflexe de retrait.
- Répéter les étapes 7 à 15.
 - Lorsque terminé, ne pas oublier de remettre à zéro le débit d'O₂ et d'isoflurane et de laver la cage d'induction d'anesthésie.

7. AMPUTATION DE DOIGT :

Cette technique d'identification n'est permise que chez la souris âgée de 0 à 7 jours et que si le tissu prélevé sert également au génotypage ou à d'autres procédures prévues au protocole. Elle doit être justifiée au protocole et autorisée par le CDEA. Un seul orteil par animal ne peut être amputé. Cela se fait habituellement à l'aide de ciseaux à iris aseptisés, sans anesthésier le souriceau.

Noter que cette technique comporte un risque d'infection qu'il faut prendre en considération.

BIBLIOGRAPHIE :

GENOTYPAGE CHEZ LA SOURIS

Bonaparte D., Cinelli P., Douni E., Héroult Y., Maas M., Pakarinen P., Poutanen M., Lafuente M.S. and Scavizzi F. (2013) FELASA guidelines for the refinement of methods for genotyping genetically-modified rodents: a report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group. *Laboratory Animals* 47(3):134-145.

CCPA, Lignes directrices du CCPA : les soins et la gestion des animaux en science, mars 2017

CCPA, Lignes directrices du CCPA : Les souris, version septembre 2017

Chen Z., Mantha R.R., Chen J.S., Slivano O.J. et Takahashi H. (2012) Non-invasive genotyping of transgenic animals using fecal DNA. *Lab Animal* 42(4):102-107.

Hamann M., Lange N., Kuschka J. et Richter A. (2010) Non-invasive genotyping of transgenic mice: Comparison of different commercial kits and required amounts. *Alternatives to Animal Experiments* 27(3):185-190.

Picazo María García-Olmo G., Dolores C., DNA from tissues of young mice is optimal for genotyping, *Electronic Journal of Biotechnology* 18 (2015) 83–87

Robinson V., Morton D.B., Anderson D., Carver J.F.A., Francis R.J., Hubrecht R., Jenkins E., Mathers K.E., Raymond R., Rosewell I., Wallace J. et Wells D.J. (2003) Refinement and reduction in production of genetically modified mice. *Laboratory Animals* 37(Suppl. 1):1-49.

APPROBATION :

_____	_____	_____	_____
Directrice	Date	Président du CDEA	Date
_____	_____	_____	_____
Responsable des soins animaliers	Date	Chef des services vétérinaires	Date

DATES DE MODIFICATION :

2007-02-01
2018-01-29 SM