# STAL

Sciences & Techniques de l'Animal de Laboratoire

## **TRIBUNE**

Du sens des mots expérience et habilité

## **ACTUALITÉS**

2ème journée du RAM

## ARTICLES

L'AAALAC International en Europe Génétique de la pigmentation chez la souris Intérêts de la QPCR en transgénèse lentivirale Evaluation de la douleur chez la souris Intérêts du modèle *C. elegans* 













# SAFE, la solution pour le développement sécurisé de vos expérimentations animales.

Au même titre que le facteur génétique, le facteur aliment a une influence directe sur le phénotype de vos animaux expérimentaux.

Afin d'éviter toute dérive de vos études, chez SAFE, le facteur aliment est parfaitement maîtrisé et constant. C'est notre engagement.

A l'heure où tout le monde parle de crises alimentaires et sanitaires, SAFE agit.

Notre site dédié laboratoire fonctionne comme une activité alimentation infantile, parfaitement en ligne avec les exigences BPL et BPF.

Le résultat est un niveau de sécurité alimentaire, sanitaire et vétérinaire unique dans cette industrie.

Tous les jours notre équipe s'attache à vous donner le meilleur service, n'hésitez pas à la solliciter au www.safe-diets.com

Nous vous remercions de la confiance que vous nous accordez chaque jour.

L'équipe SAFE

Safe, au coeur du processus de recherche





#### SCIENCES ET TECHNIQUES DE L'ANIMAL DE LABORATOIRE

Revue à comité de lecture publiée par l'association française des sciences et techniques de l'animal de laboratoire





Pour tout ce qui concerne

#### **RÉDACTION DE LA REVUE**

S'adresser au Rédacteur en Chef : M. A. DORIER E-mail : stal@afstal.com

### ABONNEMENTS

S'adresser à A.F.S.T.A.L. 28, rue Saint-Dominique 75007 Paris E-mail : stal@afstal.com

France: 80 € - Etranger: 92 €

### PUBLICITÉ DE LA REVUE

Les textes publicitaires insérés dans la revue n'engagent que la responsabilité des annonceurs

CRÉATION / IMPRESSION IMPRIMERIE REY 6, rue du Périgord 69330 MEYZIEU Tél. 04 37 44 3000

# **SOMMAIRE**

EDITORIAL	p 5
ACTUALITÉS En bref Deuxième journée du Réseau des Animaleries de Montpellierp	р9
FRIBUNE Parler les mots malp	19
Du nématode <i>Caenorhabditis elegans</i> et	27 38 49
NFORMATIONS DIVERSES  En bref	77 79
	ACTUALITÉS En bref Deuxième journée du Réseau des Animaleries de Montpellier BALINA PARTICLES Parler les mots mal Pourquoi on en voit de toutes les couleurs Pourquoi on en voit de toutes les couleurs Pourquoi el la fiabilité et de la précision des expressions faciales pour évaluer la douleur chez la souris Du nématode Caenorhabditis elegans et de son utilisation en laboratoire  Pourquoines et de la fiabilité et de la précision des expressions faciales pour évaluer la douleur chez la souris Pour évaluer la douleur chez la souris Pour évaluer la douleur chez la souris Pou nématode Caenorhabditis elegans et de son utilisation en laboratoire Pourquoi on en voit de toutes les couleurs Pourquoi on en voit de t



# www.sdsdiets.com

the essential resource for quality research diets

SDS – Dietex France 75 rue du Général Leclerc 95210 SAINT GRATIEN – France Tel: +33 (0)1 30 10 94 94 Fax: +33 (0)1 30 10 94 99 Email: france@sdsdiets.com

# **EDITORIAL**



Crédit photo : Marion Bérard

Pour la deuxième année consécutive, STAL publie quatre numéros par an. Ce numéro de STAL, va clore une année 2010 riche en actualités pour notre association et notre environnement professionnel. Notre colloque de Lyon qui s'est déroulé du 24 au 26 novembre 2010 a été un franc succès. En effet, la fréquentation a été plus élevée que pour les colloques d'automne organisés précédemment par l'AFSTAL et nous avons pu constater une affluence constante d'un public attentif et curieux dans la salle de conférence. Les exposants, ont, nous l'espérons, bénéficié de l'évènement pour initier de nouveaux contacts et aller à la rencontre de leur clientèle. Ils ont une fois de plus répondu présents à nos sollicitations et ont largement participé au succès de cette réunion. Je tiens à les remercier au nom de l'association.

Ce colloque a été l'occasion d'une Assemblée Générale au cours de laquelle le Conseil d'Administration et le bureau ont été modifiés. Je remercie les membres sortants pour leur engagement dans l'association et plus particulièrement Michel Provence, et Marion Bérard pour leur implication dans la mise en place de la nouvelle formule de STAL, colorée et attrayante. Marion, qui en deux ans de présidence de l'AFSTAL, par son dévouement et son enthousiasme communicatif, a notamment dynamisé les relations avec les autres associations francophones, stimulé la refonte de notre site internet et consolidé la présence de l'AFSTAL dans les instances européennes.

En cette occasion, le Pr Hélène Combrisson a remis, au nom de l'AFSTAL, pour la première fois, le Prix Chantal Autissier, en présence de M. Autissier, qui nous a fait l'honneur de sa présence, et d'une œuvre d'art qui symbolisera ce prix. M. Charlet a reçu ce prix pour son travail sur la détection de la douleur chez le Rat.

Dans ce numéro, nous poursuivons la présentation des acteurs du paysage de l'expérimentation animale au travers d'un article sur l'AAALAC (Association for Accreditation and Assessement of Laboratory Animal Care). La souris tient toujours une place majeure dans nos laboratoires ; ainsi, vous pourrez lire trois articles qui lui sont dédiés. Parmi eux, l'article proposé par Maud Scotto tient une place particulière : son travail a été tout d'abord aidé par une bourse d'étude de l'AFSTAL puis, la présentation orale qu'elle a faite le 25 novembre à Lyon a été élue par les congressistes « meilleure communication courte ». A ce titre, elle a reçu un second prix de l'AFSTAL. Nous découvrirons un nouveau modèle, au travers d'une revue sur l'intérêt de l'utilisation de *C. elegans*. Petite innovation, un poster vous est proposé au centre du numéro, afin d'illustrer les théories sur la génétique de la robe des souris par un petit clin d'œil. Cet éditorial est l'occasion, au nom du Conseil d'Administration de l'AFSTAL, de vous souhaiter une excellente année 2011. STAL est votre journal, grâce à ses 4 numéros annuels, il est aussi un lien entre nous. N'hésitez pas à soumettre vos articles originaux, traductions d'articles, revues et actualités qui seront toujours les bienvenus.

#### ■ Samuel Vidal

Président de l'AFSTAL





# Balb/c nude LA souris nude



Le Genest St Isle - CS4105 53941 ST BERTHEVIN Cedex FRANCE

Tél.: +33 (0) 2 43 02 11 91

Fax: +33 (0) 2 43 02 00 15 / +33 (0) 1 41 30 84 65

E-mail: infoservices@janvier-europe.fr

www.janvier-europe.com



# **ACTUALITÉS**

# **En bref**



Crédit photo : Marion Bérard Vie de l'Association

#### **Colloque annuel**

Le colloque annuel a eu lieu à Lyon du 24 au 26 novembre 2010 et a connu un grand succès en rassemblant 650 participants dont 360 exposants avec leurs invités.

Lors de la soirée de gala du colloque, le 1er prix Chantal Autissier a été attribué à Alexandre Charlet pour son travail de thèse sur l'évaluation de la douleur en expérimentation animale. Les premiers retours ont été très positifs quant à l'intérêt des sujets, la qualité des présentations et de l'organisation. Afin d'améliorer les prestations des futurs colloques, un questionnaire de satisfaction va vous être envoyé. Merci à tous pour votre participation.

L'Assemblée Générale de l'AFSTAL s'est tenue pendant le colloque et le nouveau bureau a été élu à cette occasion.

Florence Arnal (Secrétaire suppléante), Stéphanie Durand, Sébastien Paturance (Trésorier), Alain Dorier (Vice président), Hervé Pointu et Charles Henri Cottart intègrent le conseil d'administration de l'association, les autres membres sont Samuel Vidal (Président), Catherine Maisonneuve, Christophe Charnay (Trésorier suppléant), Elodie Bouchoux (Secré-

taire), Jean Louis Thoumas, Chantal Martin et Hugues Contamin.

Le prochain colloque se déroulera en région parisienne du 25 au 27 mai 2011. Le thème vous sera bientôt communiqué.

#### Ateliers du Tour de France

L'atelier « Sanitaire » s'est finalement déroulé à l'Université de Nice –Sophia Antipolis (UNS) – Valrose le jeudi 14 octobre 2010 avec la participation de 23 personnes. Nous voudrions remercier tout particulièrement Nicolas GUY et les sponsors qui ont activement concouru au succès de cette journée.

Poursuivant son tour de France, cet atelier fera étape au Centre de Neurochimie de Strasbourg, le mardi 14 décembre 2010. Ouvert à nos collègues suisses, il est accrédité comme une journée de perfectionnement par la Société Suisse des Vétérinaires Cantonaux.

Le programme du prochain atelier intitulé « Observation et suivi des animaux de laboratoire : bonnes pratiques au quotidien » est achevé. Les thèmes abordés et les conférenciers sont présentés ci-après :

- > Approche globale du bien-être animal : Dominique Autier-Derian
- > Reconnaissance des signes cliniques chez les rongeurs et lagomorphes : Aurélie Girod
- > Détection et prévention de la douleur : Stéphane Junot
- > Mise en place de points limites : Sophie Picavet
- > Prévention et traitement du stress : Dominique Autier-Derian

< Questions diverses : tous les orateurs

Cet atelier pourrait commencer son tour de France au cours du premier trimestre 2011.

Vous trouverez bientôt toutes les informations relatives à son déroulement en vous connectant sur le portail du site Internet de l'AFSTAL http://www.afstal.com/.

Nous nous permettons de vous rappeler qu'il est indispensable que vous vous inscriviez au préalable auprès de l'AFSTAL (cf. affiche : afstal@free.fr) et de vous signaler que nous sommes contraints de limiter le nombre de participants à 80. Si, après votre inscription, vous vous trouviez dans l'impossibilité d'assister à cet atelier, merci de nous en avertir afin de nous permettre d'offrir votre place à un autre candidat.

L'adresse complète et les moyens d'accès vous seront communiqués lors de la confirmation de votre inscription par le secrétariat de l'AFSTAL.

#### ComTech AFSTAL



L'équipe de la ComTech a le plaisir de vous convier gracieusement à son 9° Symposium qui aura lieu le jeudi 27 janvier 2011 à Paris. Ce symposium, animé par Bernard Andrieux, a pour thème : « Son et lumière - Plein feu sur l'ambiance ». Vous trouverez le programme et toutes les informations utiles relatives à cette journée en vous rendant sur le site :

# **ACTUALITÉS**

#### www.alphavisa.com/comtech2011/

où vous pourrez : soit télécharger et imprimer le bulletin d'inscription que vous renverrez complété à Alpha Visa Congrès, soit remplir le formulaire d'inscription en ligne. Nous vous invitons également à porter une attention particulière sur les modalités du concours photos qui vous est proposé.



#### ComVet AFSTAL

Après l'Ecole Vétérinaire d'Alfort en 2009 pour une journée dédiée au médicament vétérinaire en expérimentation animale, c'est l'Ecole Normale Sup' de Lyon qui a accueilli le cru 2010 de la réunion ComVet le 23 novembre avec la participation de 32 personnes.

Cette journée a permis d'aborder différents thèmes chers à la ComVet : sanitaire, réglementaire et éthique. La session Sanitaire a permis d'aborder des cas pratiques de contamination au parvovirus murin (MPV), de faire un état des lieux sur le norovirus murin (MNV) et d'aborder en détails l'état des connaissances sur la pathologie jusqu'alors associée au Rat Respiratory Virus et qui fait l'objet actuellement de remises en question.

En matière de Réglementation, une revue de la Directive 2010/63/EC a été effectuée afin d'aborder les différents points qui posent question.

Enfin, la Bientraitance animale a été au centre de discussions relatives aux techniques d'euthanasie des rongeurs au CO2 et à la mise en place d'un programme d'enrichissement de l'environnement. Ces derniers points donneront lieu à de futurs développements au sein de la ComVet sous forme de groupes de réflexion dédiés.

#### **STAL**

Nous vous rappelons que vous pouvez soumettre vos articles pour publication dans STAL en les envoyant à stal@afstal.com. ■

#### Site Web

Nous vous rappelons que le site comprend désormais un espace adhérent (avec accès sécurisé et réservé aux adhérents à jour de leur cotisation) destiné à héberger les supports de certaines présentations qui auront été faites dans le cadre des collogues et réunions des groupes de travail AFSTAL, ainsi que les archives de certains numéros de la revue STAL. Plus généralement, le www.afstal.com est le vôtre et nous avons besoin de vous pour le faire vivre. N'hésitez pas à nous communitoutes remarques auer informations qui pourront l'enrichir et être partagées par l'ensemble de notre communauté. Pour cela, écrivez à afstal@free.fr.

#### Réglementation

#### Révision de la directive 86/609

Rappel : Le Parlement Européen a adopté le 8 septembre le texte révisé de la Directive 86/609.

Le travail de transposition en droit français doit être finalisé d'ici 2 ans (novembre 2012).

Deux réunions ont déjà eu lieu avec les représentants des ministères de la santé, de l'agriculture, de la recherche, des représentants des organismes privés et publics afin de réfléchir et démarrer ce travail de transposition.

# **ACTUALITÉS**

# Deuxième journée du Réseau des Animaleries de Montpellier



■ Florence Arnal Jean-Damien Arnaud Karim Chebli

Pour plus d'informations, n'hésitez pas à visiter notre site web :

http://www.ram.cnrs.fr/

#### Remerciements

Toute l'équipe d'organisation de cette journée remercie chaleureusement nos sponsors (Basan, Charles River, DSI, Harlan, Janvier, Safe, Serlab, Souralit, Tecniplast, Viewpoint) ainsi que les IFR3 et IFR122 sans qui cette journée n'aurait pu avoir lieu.

Un grand merci enfin au comité d'organisation de cette journée : Florence Arnal, Jacques-Damien Arnaud, Karim Chebli, également à Mickael Autuori pour la gestion, à Monique Anoal pour la coordination, et à Muriel Gien-Asari pour l'infographie.

Pour sa deuxième journée annuelle qui a eu lieu le 14 octobre 2010 à Montpellier, le Réseau des Animaleries de Montpellier (RAM) a réuni plus de 100 personnes.

Le RAM vous invite chaque année à partager nos connaissances pour tendre vers la qualité indispensable aux enjeux de la recherche et aux impératifs de protection et de bien-être animal.

Cette journée a été l'occasion de vous présenter différents savoir-faire présents au sein du RAM, de communiquer sur de nouvelles techniques, de nouer des contacts et enfin de promouvoir le réseau.

Cette année, cette journée avait pour thème : la création de modèles animaux et l'éthique.

Une présentation des différents modèles animaux (au sens large) déjà en place sur le réseau et des possibilités de créations de modèles animaux ont été faites. La création de nouveaux modèles animaux plus pertinents s'inscrit dans une démarche éthique. L'éthique a également été mise en avant au cours de cette journée.

# La première session s'est intéressée à la création de modèles animaux.

C Begon-Pescia a présenté la plateforme de recombinaison homologue de l'institut de génétique moléculaire de Montpellier.

S Ménoret (Plateforme de transgénèse des rats de Nantes) a présenté la génération de rats déficients en immunoglobulines en utilisant des zinc finger nucleases pour cibler le locus des IgM.

Les zinc finger nucleases constituent un outil puissant permettant la genèse de modèles KO et KI dans les espèces animales où les cellules ES ne sont pas disponibles ou sont trop coûteuses. De plus, il ne faut que trois semaines pour générer un rat KO contrairement aux techniques classiques de recombinaison homologue qui nécessitent 1 à 1,5 an pour obtenir un KO. Un des freins à l'utilisation de ces zinc finger nucleases reste néanmoins leur coût.

#### La deuxième session s'est focalisée sur des modèles Vertébrés autres que les Rongeurs de laboratoire.

P de Santa Barbara (Inserm ERI25) a présenté le modèle aviaire qui a largement contribué à établir nos connaissances sur le développement des Vertébrés supérieurs grâce aux différentes expériences d'embryologie expérimentale qui lui ont été appliquées (recombinaison caille-poulet). Aujourd'hui, le développement de nouvelles approches telles que la transgénèse rétrovirale, l'électroporation in vivo ou l'analyse transcriptomique remet en lumière les potentialités de ce modèle animal. La combinaison des expériences d'embryologie expérimentale et des nouvelles approches d'étude moléculaire devrait permettre de faire du modèle aviaire un modèle de choix pour l'étude de la biologie du développement, des cellules souches, du cancer et de l'environnement.



D Ciocca du Chronobiotron de Strasboura a présenté le modèle Arvicanthis ansorgei. C'est un Rongeur d'origine africaine qui présente la particularité d'être diurne. Ces dernières années, il s'est imposé comme un modèle fort pour l'étude des rythmes biologiques car par comparaison avec les Rongeurs classiques de laboratoire (tous nocturnes), il a permis une meilleure compréhension des mécanismes expliquant la nocturnalité et la diurnalité, challenge des chronobiologistes. En effet, le caractère diurne ou nocturne d'une espèce ne reposerait pas sur un fonctionnement différentiel de l'horloge centrale mais sur la manière dont les signaux générés par cette horloge seraient intégrés au niveau des structures cibles.

L'homme étant diurne, Arvicanthis est un bon modèle pour les approches biomédicales et permet de modéliser les troubles du rythme qui conduisent plus ou moins rapidement au développement de certaines pathologies. Egalement, pour l'étude de la rétine, Arvicanthis est un modèle intéressant pour modéliser certaines pathologies rétiniennes observées chez l'homme, qu'elles soient associées ou non à des troubles des rythmes biologiques. Arvicanthis niloticus (espèce jumelle d'Arvicanthis ansorgei) développe spontanément un diabète de type 2, ce qui peut être utile pour mieux appréhender l'étiologie du diabète de type 2 et tenter d'ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques.

N Mestre-Frances (INSERM U710) a ensuite introduit le microcèbe qui est un modèle Primate de maladies neurodégénératives.

C'est un Primate de petite taille (faible coût d'hébergement), de longévité modérée (8 à 12 ans) et disponible car il est élevé au sein de l'animalerie de l'Université Montpellier 2. Son vieillissement peut être accru avec un cycle photopériodique accéléré : 5 mois d'été (jours longs) et 3 mois d'hiver (nuits longues). 10 % des microcèbes âgés développent des plaques amyloïdes. Un essai de sélection génétique est en cours afin d'avoir plus de chances d'avoir des animaux porteurs de plaques.

Il est également utilisé en tant que modèles induits : maladie d'Alzheimer par transfert du gène APP avec un adénovirus canin, maladie de Parkinson par transfert du gène LRK2. Enfin, le microcèbe sert également pour l'étude de maladies à prions. Selon la souche de prion inoculée, il développe ou non la maladie.

Cette session s'est terminée avec l'évaluation et l'efficacité de thérapeutiques innovantes chez le Primate présenté par Oumeya Adjali de l'Institut de Recherche Thérapeutique de Nantes. Les modèles de Rongeurs ont permis de faire la preuve de concept de diverses stratégies thérapeutiques innovantes telles que le transfert de gène thérapeutique. L'évaluation de ces protocoles thérapeutiques nouveaux dans modèles animaux plus pertinents d'un point de vue clinique est de plus en plus recommandée, voire exigée par les autorités réglementaires sanitaires avant toute translation clinique. Dans le domaine de la thérapie génique à l'aide de vecteurs AAV (Adeno-Associated-Virus), des protocoles divers et variés chez le rongeur résultent en général en un transfert de gène efficace à long terme après une seule administration de vecteur. Néanmoins, la translation préclinique

de ces protocoles dans les modèles gros animaux a révélé un obstacle maieur. En effet, l'efficacité du transfert de gènes s'est révélée dans ce cas souvent transitoire en raison d'une immunotoxicité dirigée contre le transgène et/ou capside virale. Cet exemple illustre l'intérêt du modèle Primate qui reste malgré ses défauts inhérents (coût, éthique, manque de réactifs spécifiques, études longues et complexes, variabilité entre les individus...) un modèle très pertinent pour l'évaluation préclinique, aussi bien en terme d'efficacité que de toxicité, de protocoles de thérapie génique, cellulaire et d'immunomodulation avant l'essai clinique chez l'homme.

#### La troisième session s'est intéressée aux modèles d'Invertébrés.

S Galas (Université Montpellier 1) a introduit le modèle Caenorhabditis elegans : un modèle de 959 cellules au laboratoire. D'une longueur de 1 mm, le nématode Caenorhabditis elegans s'impose progressivement grâce à ses contributions pionnières déjà récompensées par les Prix Nobel de Médecine (2002; 2006) et Prix Nobel de Chimie (2008) pour les découvertes de l'apoptose, du mécad'interférence nisme ARN (épigénétique) ou encore de la GFP. La publication du génome du Nématode Caenorhabditis elegans en 1998 a marqué un tournant dans l'ensemble des programmes séquençage puisque, pour la première fois, le génome d'un organisme métazoaire était décrypté.

Depuis cet inventaire moléculaire, il est rapidement apparu que près de 67 % des gènes associés à des pathologies chez l'homme avaient un 11



### Réseau des Animaleries Montpelliéraines RAM



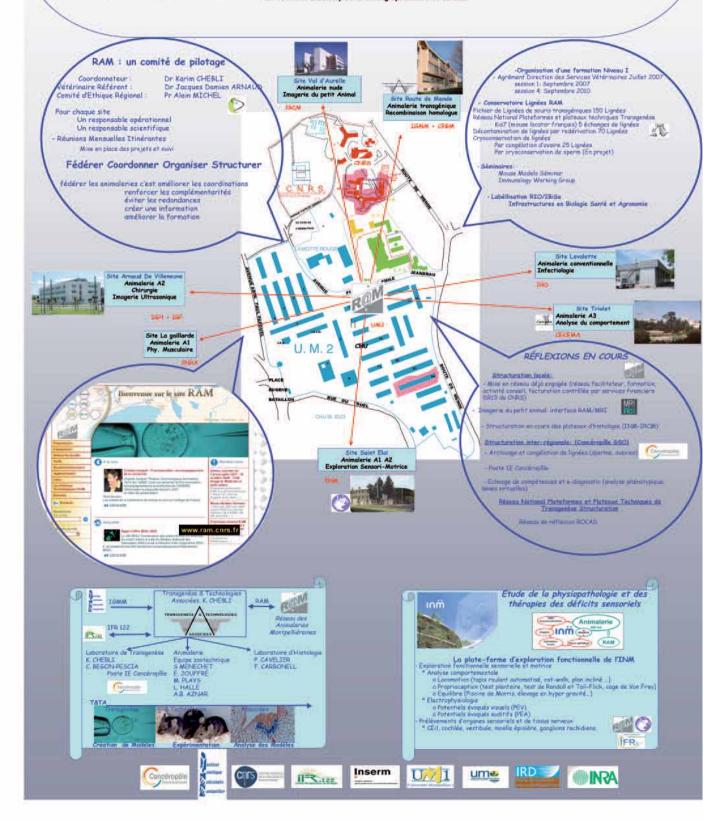
#### A COORDINATED NETWORK OF ANIMAL FACILITIES IN MONTPELLIER

Several distinct facilities, each focused on a particular type of expertise (development of transgenic mouse models, functional analysis of sensori-motor disorders, cardiovascular diseases, neurophysiology, infectious diseases, small animal imaging) will have a common scientific as well as administrative management to create a network of synergistic animal facilities (RAM for Réseau d'Animaleries Montpélliéraines). For more information consult our site. Even though all state of the art technologies expected on such a platform are available: E5 cells culture, homologous recombination, all aspects of small animal imaging techniques (fluorescence, gammagraphy, echography), screening platform for oncology, we should stress two important specificities:

- Long-term storage of sperm and ovaries to ope with the increasing demand for mouse studies and transgenic-based projects.

- Access to an A3/L3 facility with the possibility to carry out experiments on microcebes

The first objective is to make available to any investigator a wide repertoire of specialized expertise. Through the professional guidance of a steering committee which will direct him/her to the best qualified site. A second objective is to organize the technological platforms in continuity with standard animal husbandry to avoid redundancy by concentrating means and expertise. Although it may occasionally turn out to be necessary to maintain local technical platforms to meet on-site needs, this network will definitely favor strong specialized structures



équivalent chez ce petit ver de 1 mm de long. Caenorhabditis elegans peut être maintenu au laboratoire de plusieurs facons (milieux de cultures. alimentation, etc) qu'il est possible de combiner avec des traitements par des molécules exogènes ou métabolites secondaires tout en tirant avantage du grand nombre de mutants génétiques déjà disponibles ou encore des ciblages moléculaires par ARN interférence ou transgénèse. Grâce à ces caractéristiques, plusieurs stratégies ont d'ores et déjà été développées afin de générer des cribles intéressants pour la santé humaine ou encore pour décrypter certains programmes à l'origine de mécanismes physiologiques régulateurs complexes.

S Galas a également illustré comment l'utilisation combinée des informations déjà disponibles sur ce modèle permet encore à *Caenorhabditis elegans* de contribuer à l'émergence de nouveaux concepts de recherches et de travail.

A Garces (Institut des Neurosciences de Montpellier) a présenté la drosophile : un cobaye épatant.

Sur un plan génétique, la drosophile (la mouche du vinaigre) et les vertébrés (dont l'Homme) sont similaires. En effet, environ 75 % des gènes responsables des maladies humaines sont retrouvés dans le génome de cet insecte. Au cours des dix dernières années des lignées de drosophiles atteintes de cancers, de la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, ou d'Huntington ont été établies. Ces mouches mutantes sont utilisées comme de

puissants modèles génétiques qui permettent de décortiquer les voies de signalisation et les mécanismes moléculaires mis en jeu dans ces maladies. De façon générale, l'utilisation de la drosophile permet de s'affranchir des limitations éthiques et financières posées par l'expérimentation animale.

M Deage de l'IGF a ensuite souligné l'intérêt du venin de mygales pour la recherche de ligands analgésiques, potentiels médicaments de demain. Les mygales sont des prédateurs qui se nourrissent d'une grande variété de proies vertébrées et invertébrées. La diversité des niches écologiques associées à la diversité des comportements de prédation corrèlent avec la diversité importante de leurs venins.

Le venin est très efficace et renferme un cocktail de neurotoxines qui agissent rapidement sur le système nerveux de leurs proies pour les paralyser. Cette caractéristique fait de leurs venins une source très intéressante de nouveaux ligands très sélectifs destinés notamment à l'étude des canaux ioniques et des récepteurs membranaires.

#### La quatrième et dernière session de la journée s'est focalisée sur l'éthique.

La société Viewpoint a présenté la cage Marlau. Celle-ci permet une standardisation de l'enrichissement et contribue au raffinement zootechnique au service de l'animal et de la science.

L'enrichissement vise à accroitre le bien être physique et psychologique par l'apport de stimuli conformes aux besoins spécifiques de l'espèce de l'animal. Il est suivi de l'amélioration des capacités cognitives. Il soutient le développement de mécanismes permettant une meilleure adaptation au stress, une meilleure résistance aux processus pathologiques et une réponse thérapeutique qui peut être différente de celle obtenue en condition non enrichie.

A Michel (Université Montpellier 1) a ensuite introduit l'éthique en expérimentation animale. L'éthique c'est répondre à ces trois questions : que veux-je faire ? Que puis-je faire ? Que dois-je faire ? Dans le respect de la règle des 3R et du rapport coût/bénéfice.

Enfin, JP Martinolle (Sanofi-Aventis Montpellier) a présenté le comité d'éthique du site Sanofi Montpellier : CEPAL (Comité d'Ethique pour la Protection des Animaux de Laboratoire) en mettant en lumière les spécificités d'un comité d'éthique encadrant des activités de recherche et de développement préclinique dans le secteur pharmaceutique.

Cette journée a rencontré un très bon accueil et nous vous donnons rendezvous en octobre 2011 pour une nouvelle édition.



- Des Solutions Flexibles
- Un Accès aux Experts Scientifiques
- Une Sécurisation du Site En-Ligne
- Un Panel Large de Services Associés

Pour plus d'informations sur les solutions d'élevage à façon de Taconic, voir www.taconic.com/etac ou contacter nous au tel. 06 87 10 32 44 • 04 78 62 05 51 ou taconiceurope@taconic.com



## **Balina**

# Eau douce, eau dure, au secours!



Crédit photo : : UAR

Dans chaque numéro, cette rubrique BALINA présentera le reflet d'un thème qui a été débattu sur le site ANILAB, rédigé par Bernard Andrieux avec la complicité de ceux qui sont intervenus dans le débat suscité par les questions.

#### Avec l'aide de :

- Jacques-Damien Arnaud
- Elizabeth Huc
- Michèle Pauchard

#### Oue choisir comme eau d'abreuvement dans les établissements d'expérimentation animale ?

Une eau est potable quand elle satisfait aux caractéristiques du décret de 2001-1220 qui la rendent propre à la consommation humaine. La qualité d'une eau dépend de critères organoleptiques (couleur, turbidité, odeur, saveur), de paramètres physico-chimigues naturels (température, pH, chlorures, sulfates, ...), de la présence de substances indésirables (nitrates, nitrites, pesticides, ...), et de la présence de substances toxiques (arsenic, cadmium, plomb, hydrocarbures, ...) et de micro-organismes pathogènes. Dans la mesure où les hommes disposent d'une eau du robinet « potable », tout laisse à penser que cette eau devrait pouvoir convenir aussi aux rats et aux souris.

Ce n'est pas si simple, car, selon les régions, cette eau n'a pas la même qualité. Certes, elle est exempte de micro-organismes, mais sa composition en sels dissous est fonction de la géologie dans laquelle les eaux sont capturées pour être rendues potables. Particulièrement, elle va être plus ou moins chargée en sels de calcium: dans les massifs granitiques l'eau est « douce » (moins de 200 mg de calcaire par litre) alors que dans les bassins sédimentaires calcaires elle est « dure » (jusqu'à 1000 mg/L). Cette dureté s'exprime aussi par le titre hydrotimétrique en degrés français (°F), l'eau douce est inférieure à 15°F, l'eau dure est supérieure à 24°F, et certains disent qu'une bonne eau pèse 7°F. Si l'eau du robinet est le reflet de l'eau capturée, aucune norme cependant n'est exigible dans la mesure où le taux de calcium n'a pas de répercussion sanitaire, dit-on, D'ailleurs, quand on examine les teneurs en sels des eaux en bouteille (= minérales) qui sont en vente libre on peut constater que les taux de calcium vont de 11 à 550 mg/L, sans parler de ceux du magnésium de 8 à 110 mg/L et du sodium de 5 à 1700 mg/L, ce qui prouve bien (?) que ces taux ne doivent pas avoir une grande incidence sur la santé humaine, surtout quand on sait qu'une eau douce peut apporter 0,2 % des besoins en calcium alors qu'une eau dure apporte 17 % de l'apport nutritionnel recommandé qui préconise un minimum de 11mg/kg/j de calcium, un minimum de 5 mg/kg/j de magnésium, et un maximum de 34 mg/kg/j de sodium.

Les sels sont peut-être inoffensifs, mais l'eau peut contenir, en plus, des oligoéléments ou des polluants en quantités variables. La preuve en est que des seuils de potabilité ont été définis par précaution : l'arsenic est limité à 10 µg/L, le fluor à 1,5 mg/L, le fer à 0,2 mg/L, les nitrates à 50 mg/L, et les pesticides (plus de 800 substances différentes) à 0,5 µg/L sans qu'une seule substance ne dépasse 0,1 µg /L, sans parler du radon, si bien que on peut affirmer que selon les localités, les animaux ne seront pas lotis de la même eau.

Néanmoins, hommes et bêtes qui ne 15

## **Balina**

vivent pas que d'eau fraîche, survivent, quelle que soit l'eau consommée, car c'est la nourriture qui est capable de subvenir à leurs besoins.

Adoptons donc cette conclusion, même si un certain nombre d'auteurs et de pathologies indiquent que des surcharges ou des carences peuvent avoir des répercussions sanitaires dans certains cas.

Une fois acquis que la composition de l'eau n'a pas une grosse incidence sur les résultats expérimentaux, compte-tenu de la durée de vie des animaux et de la pratique quotidienne, on pourrait cependant se demander s'il n'est pas impossible qu'elle en ait. L'idéal serait donc de savoir quelle est l'eau bonne et de connaître les limites d'une eau acceptable, il semblerait que ce ne soit pas très simple déjà pour l'Homme, alors pour les Rongeurs!

Les réponses faites sur Anilab reflètent cette complexité, puisque les méthodes proposées, témoignages de nombreuses années de pratiques satisfaisantes, qui sont rapportés (hélas sans que des détails soient fournis sur l'eau traitée qui a pu évoluer au cours du temps à la suite de trayaux dans l'usine de traitement

des eaux, de la pollution de la nappe ou de la qualité des canalisations) montrent une belle diversité de vérités ou d'incertitudes.

Première méthode: ne pas utiliser d'eau adoucie car les filtres sont vite colonisés, mais faire une analyse au robinet pour s'assurer de la qualité du réseau interne de distribution, et comparer les résultats aux normes de l'eau de ville...

**Deuxième méthode** : utiliser de l'eau adoucie mélangée à 50/50 avec de l'eau du robinet pour prévenir des risques d'infertilité...

**Troisième méthode** : si l'eau n'est pas trop calcaire, la filtrer sur du sable et des fibres de polypropylène avant de la traiter aux UV et de l'autoclayer dans les biberons...

**Quatrième méthode** : autoclaver l'eau brute, puis la filtrer pour éliminer les dépôts...

**Cinquième méthode** : utiliser de l'eau adoucie ou de l'eau distillée en évitant l'eau osmosée inverse...

**Sixième méthode** : acidifier l'eau dure...

**Septième méthode** : filtrer à 22 microns malgré le coût et la colonisation des filtres par des microorganismes)...

**Huitième méthode** : éviter l'eau déminéralisée qui n'est pas compatible avec la vie, comme l'eau osmosée inverse, et la milli Q...

On le voit, la variété des méthodes, et des contre-vérités, montre que l'idéal n'est pas défini car les paramètres ne sont pas bien cernés et les solutions ne sont pas bien fondées. Mais c'est peut-être aussi que la composition minérale de l'eau, si tant est qu'elle n'est pas polluée, n'a finalement pas une grande importance.

Quoi qu'il en soit, de nombreux étapour lever toute blissements. incertitude, abreuvent désormais leurs rongeurs avec de l'eau osmosée inverse, parfois filtrée à 0.22µm. Même si en Belgique celle-ci n'est pas autorisée à la consommation, il est admis cependant (?) qu'elle est assez pure pour garantir un bon abreuvement à condition qu'elle ne contienne pas plus de 250 mg/ de sels minéraux. Son pH est de 6,5 généralement, elle est exempte de tout micro-organisme et ne nécessite pas de complémentation alimentaire.

Il en coulera encore beaucoup sous le pont avant que l'on sache quelle est la bonne eau, néanmoins ce serait assez intéressant de le savoir.

## **Balina**

# Quelle est la dose de DMSO qui est bien tolérée par les rongeurs en intra veineux ?

Avec l'aide de :

- **■** Véronique Vives
- Valérie Polard

Le Diméthylsulfoxide est un véhicule classique pour la dissolution de produit non-soluble dans l'eau ou le sérum physiologique. Mais jusqu'à quelle dose demeure-t-il inoffensif pour l'animal ?

Dans leur revue de 2006, Gad et *al.* rapportent que des doses de 200 mg/kg chez le Rat, de 1 ml/kg chez le Cochon d'Inde, de 1,25 ml/kg chez le Chien sont bien tolérées. Le DMSO est toujours associé à d'autres vecteurs en ne représentant que 5% du mélange (par exemple avec : sérum physiologique 80%, éthanol 10% et Crémophore ®EL 5%), mais on peut monter jusqu'à 10%. Par ailleurs, la DL 50 du DMSO se situe entre 2,5 et 8,9 g/kg (http://www.gaylordchemical.com/bulletins/Bulletin174/Bulletin174.pdf).

On pourra d'ailleurs consulter la fiche DEM 028 de l'INRS pour constater que le DMSO est très peu suspect de toxicité à faibles doses. Concernant une autre question posée sur Anilab, on trouvera aussi réponse dans la revue de Gad, 2006, elle concerne les doses bien tolérées de PEG 300 et PEG 400 chez la Souris, le Rat, le Cochon d'Inde et le mini porc.

Néanmoins, dans les deux cas, il ne s'agit pas des doses qui sont à la limite de la toxicité mais des constats d'innocuité...

Dans cette revue plus de 60 molécules sont référencées concernant différents animaux et les différentes voies d'administration

#### **Bibliographie**

Shayne C. Gad, Crystal D. Cassidy, Nicolas Aubert, Bart Spainhour and Heide Robbe, 2006. Nonclinical vehicle use in studies by multiple routes in multiple species, Int. J. Toxicol. 25, 499-521.



Assistant de recherche.

Il faut plus que des modèles de qualité pour faire avancer vos recherches. C'est pourquoi nous proposons une ligne complète de régimes et une large gamme de services d'aide à la recherche. Nous sommes là pour vous aider à améliorer votre recherche.

Pour plus d'informations, rendez-vous sur le site www.harlan.com

Modèles

Régimes

Services



#### www.harlan.com

©2010 Harlan Laboratories, Inc. Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks of Harlan Laboratories, Inc.

## **TRIBUNE**

# Parler les mots mal



Crédit photo : E. Servoz

#### B. Andrieux

En expérimentation animale, comme partout, les mots ont un sens. Les galvauder, sans que ce soit grave, est source de confusion, alors, maugréons un peu...

Par exemple, les mots « expérience » et « habilitation (- des expérimentateurs) » recouvrent des concepts dont les contours sont bien définis, mais trop souvent ils sont élargis, dans la conversation, de facon troublante au point de tendre vers l'erreur.

Le mot « expérience », certes, peut concerner, dans une de ses acceptions un ensemble de connaissances acquises par une longue pratique associée, ou non, à une fine analyse, à de minutieuses observations et à de pertinentes critiques. Cette expérience peut servir d'appui à une relative vérité, mais relative seulement. car il n'est pas impossible que cet empirisme généreux et sympathique conduise à des certitudes qui n'ont rien de scientifique. L'autre acception du mot concerne le test qui est réalisé pour vérifier une hypothèse. C'est de cette expérience la, qui a des contours parfois mous dans la bouche de certains, nous en avons tous fait l'expérience, dont nous allons parler.

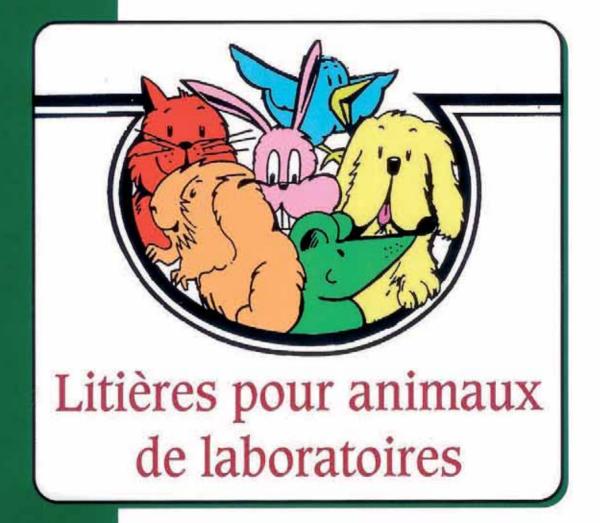
Le concept d'expérience est très bien défini, il est constituée de trois blocs indissociables: l'hypothèse, le protocole et la comparaison, il est donc surprenant qu'on se laisse aller parfois à des abus de langage qui s'écartent de cette définition.

L'hypothèse est le point de départ obligatoire de l'expérience, elle a la forme d'une affirmation de type « le facteur A ioue un rôle dans le processus B » (qu'on peut exprimer sous la forme d'une question : « le facteur A joue-til un rôle dans le processus B?). Le protocole expérimental va modifier la présence de « A », en excès ou en déficit, dans le processus, toute la difficulté étant de s'assurer que seul le facteur A a bien été modifié, et. enfin. au regard des résultats obtenus (exprimés la plupart du temps sous forme de valeurs chiffrées) et de leur comparaison avec la « normale », un constat sera fait qui confirmera ou infirmera l'hypothèse de départ, et parfois ouvrira une nouvelle piste d'investigations si les résultats obtenus ont été surprenants.

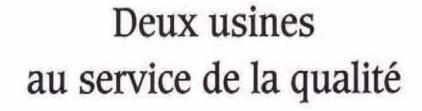
Mais attention, nous ne devons pas céder à la facilité en qualifiant d'expérience toute utilisation d'animaux à des fins scientifiques. En effet, certaines utilisations ne procèdent pas de la démarche expérimentale, par

exemple celles où les animaux sont utilisés comme de simples réactifs biologiques sans surprises pour maintenir une souche de micro-organismes, pour étudier la cinétique d'une molécule, pour titrer un composé ou pour élaborer des anticorps. Il est clair aussi que les procédures qui sont destinées à fournir du matériel biologique, directement ou après contamination des animaux, ne constituent pas des expériences. En effet, dans tous ces cas, font défaut principalement la modulation du facteur « A », et souvent l'hypothèse est réduite à la connaissance du processus dont les résultats sont en principe connus et attendus. Il faudra donc veiller à ne réserver le terme d'expérience qu'à des protocoles vraiment expérimentaux même si la nouvelle directive 2010/63 a légèrement reculé dans la clarté de son propos puisque le titre de la directive 86/609 « protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques » est devenu désormais « protection des animaux utilisés à des fins scientifiques ».

L'amalgame ne change en rien le fait que toutes les utilisations d'animaux devraient être soumises à l'avis d'un comité d'éthique, mais, on l'imagine assez bien, l'évaluation éthique sera, selon la nature des projets présentés, légèrement différente qu'il s'agisse d'une expérience sensu stricto ou d'une procédure où l'animal vivant ne sera pas directement l'objet de l'étude. Il est vrai que le titre de la Charte nationale d'éthique qui « porte sur l'expérimentation animale » pour- 19



# STERILABO COPOLABO







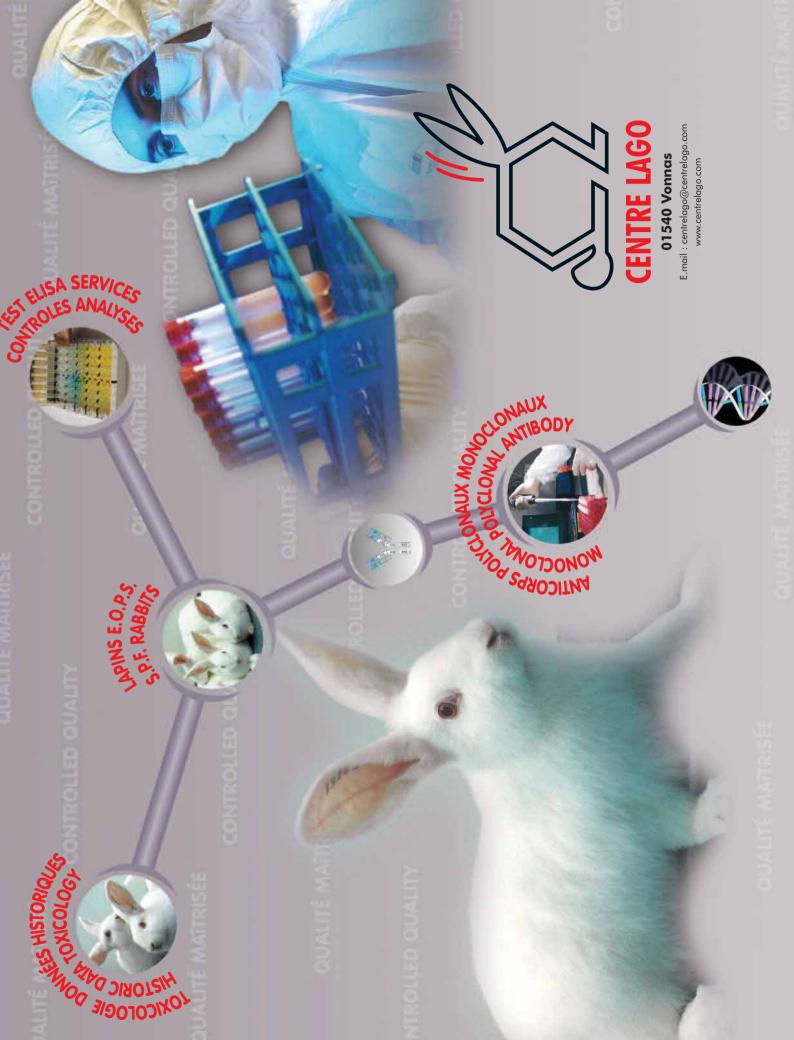
rait favoriser cette approximation de langage en laissant accroire que toutes les utilisations sont des expériences, ou que seules celles qui sont réellement des expériences sont concernées par une démarche éthique, mais la remarquable astérisque qui est associée au titre renvoie à une explication lumineuse qui indique que le terme « expérimentation animale » est pris au sens de la réglementation en vigueur, donc à « toute utilisation d'animaux à des fins scientifiques ».

Cette précision étant faite, qu'en est-il, justement dans la réglementation de l'expérimentateur habile « habilité » ? Son habileté n'est pas en cause, mais jamais dans notre pays en expérimentation animale il n'y a de personnes « habilitées ». Ce terme n'existe pas, il semblerait vouloir dire, dans l'esprit de ceux qui l'utilisent encore, que des personnes sont reconnues par l'administration comme suffisamment expérimentées pour pouvoir entreprendre des expérimentations, dans ce cas la réglementation dit que ces personnes

sont « autorisées à expérimenter ». De la même façon les zootechniciens ne sont jamais habilités, mais ils doivent être identifiés par l'administration et avoir satisfait à des enseignements réglementaires en fonction de leurs activités, et les établissements d'expérimentation animale doivent être agréés.

On le voit, les mots ont un sens, et il serait dommage qu'il y ait une pénurie des sens, parce que, en un sens, c'est assez censé.





# Les activités de AAALAC INTERNATIONAL en Europe



#### Javier Guillén

European Activities, AAALAC International. Apdo Correos 266, 31080 Pamplona, Spain. jguillen@aaalac.org

#### Résumé

Ces dernières années, le processus d'accréditation par AAALAC International en Europe soulève de plus en plus l'intérêt. Depuis 1996, AAALAC a rejoint définivement la scène internationale en établissant en particulier une structure européenne impliquant les activités de professionnels reconnus des sciences de l'animal de laboratoire. Ceci a conduit de plus en plus d'institutions à rechercher l'accréditation AAALAC en Europe.

Cet article décrit la démarche d'AAA-LAC pour devenir plus européenne, mais aussi les activités européennes liées à l'accréditation des programmes d'utilisation et de soins des animaux, ainsi que l'implication d'AAALAC dans différents forums et publications.

#### Introduction

En 1996, quand Anne-Dominique Degryse devint la première Européenne à être nommée au conseil international d'accréditation d'AAALAC (COA: AAALAC International Council on Accreditation), il était difficile d'imaginer le développement qu'AAALAC International allait avoir en Europe les années suivantes. Actuellement, grâce au soutien d'un bureau européen permanent, une section entière du COA composée exclusivement de professionnels européens s'occupe d'évaluer plus de 55 programmes d'utilisation et de soins aux animaux dans 15 pays européens, et d'autres programmes dans d'autres zones géographiques telles que l'Ile Maurice et l'Afrique du Sud. De plus, le nombre d'institutions qui cherchent à être accréditées par AAALAC ne cesse de croître.

L'internationalisation d'AAALAC a suivi plusieurs étapes à partir de 1996. Tout d'abord, le nom de l'organisation a changé, et depuis, signifie "Association internationale pour l'évaluation et l'accréditation des programmes de soins aux animaux de laboratoire" (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International). Précédemment, elle était connue comme l'association américaine pour l'accréditation des programmes de soins aux animaux de laboratoire. Le premier membre européen du COA a été nommé en 1996, le second en 2000 et le troisième en 2003. Un an plus tard, en 2004, la section européenne du COA, composée de 9 membres, a été établie. Depuis 2009, il existe également

#### Remerciements

à M. Berard pour la traduction de cet article

une section du COA pour le Littoral Pacifique. Au regard de ces changements, un poste à temps partiel a été créé en 2002 pour un Directeur Associé pour les Activités Européennes (Associate Director of European Activities), lequel s'est transformé en poste à temps plein de Directeur Supérieur et Directeur des Activités Européennes (Senior Director and Director of European Activities ) début 2008. Un Directeur Régional pour le Littoral Pacifique a aussi été nommé en 2009. Finalement, plusieurs organisations européennes incluant FE-LASA, I'EFPIA, I'ESLAV et I'IAT, ont rejoint le conseil d'administration ces dernières années.

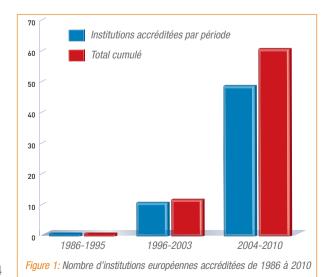
#### Les activités d'accréditation

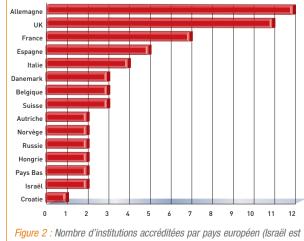
La première accréditation AAALAC en Europe a eu lieu en 1986 au Royaume-Uni, mais en 1996 seules 2 institutions supplémentaires (toutes deux françaises) avaient également obtenu leur accréditation. En 1996. quand AAALAC est devenue AAALAC International, le nombre d'institutions accréditées a commencé à croître en Europe. Cette augmentation a été beaucoup plus flagrante depuis que la section européenne du COA a été établie en 2004 (Figure 1). Il y a maintenant à peu près 60 institutions accréditées en Europe (Israël est inclus dans les analyses faites pour cet article), et de nouvelles demandes sont recues chaque trimestre. L'Allemagne, le Royaume-Uni et la France sont les pays où le plus d'institutions ont obtenu leur accréditation (Figure 2).

Les membres européens du COA dirigent les visites des sites et l'évaluation des programmes d'utilisation et de soins aux animaux dans les institutions européennes, et aussi dans d'autres pays tells que l'Ile Maurice ou l'Afrique du Sud. Ils peuvent éventuellement diriger les visites des sites dans d'autres régions du monde. Un groupe de 35 professionnels européens experts ad hoc AAALAC ("AAA-LAC ad hoc Specialists") aident les membres du COA à réaliser les visites de sites. Au cours du dernier trimestre, 4 nouvelles institutions ayant soumis une demande d'accréditation auprès d'AAALAC International (2 d'entre elles viennent de France) ont été évaluées et le COA décidera si elles peuvent être accréditées lors de sa réunion de Janvier 2011. Le COA

se réunit 3 fois par an, en janvier, mai et septembre.

Les institutions qui demandent actuellement une accréditation sont principalement issues du secteur privé, et comprennent des compagnies pharmaceutiques et des centres de recherche sous-traitants. Cependant, il v a déià aussi des institutions universitaires accréditées, et certaines organisations à but non lucratif ont également rejoint ce processus d'accréditation (Figure 3). L'environnement universitaire est souvent plus compliqué en termes d'organisation, et à l'avenir l'un des principaux défis pour AAALAC est de soulever l'intérêt de ce type d'institutions vis-à-vis du processus d'accréditation. Au cours du dernier congrès FELASA à Helsinki, un représentant d'une institution universitaire a présenté son expérience et les bénéfices qu'il a tirés en obtenant l'accréditation AAALAC. Cette présentation a soulevé l'intérêt et les questions de collègues travaillant dans des institutions universitaires. Les référentiels utilisés pour évaluer les programmes d'utilisation et de soins aux animaux sont les principes du Guide ILAR pour l'Utilisation et les





inclus dans le cadre de cet article).

Soins des Animaux de Laboratoire (Guide), la convention européenne STE123, les textes de loi applicables aux sites visités (Directive 86/609 et loi nationale/régionale), et une liste de documents spécialisés dans les différents domaines des sciences de l'animal de laboratoire et qui sont appelés "ressources de référence". Etant donné qu'il y a toujours des différences dans les exigences réglementaires à travers l'Europe, les avis professionnels et l'utilisation de référence par objectif/performance sont indispensables pour harmoniser l'évaluation des programmes d'utilisation et de soins. Une des conséquences importante de l'internationalisation d'AAALAC a été que le Guide n'est plus la seule référence, mais que d'autres, également européens, sont aussi pris en compte. Par exemple, la convention STE123 et son Annexe A avec ses standards par objectif/performance est devenue une autre des références les plus importantes.

Une autre activité qui a été mise en place en Europe est l'évaluation du niveau des programmes (Programme Status Evaluation (PSE)). Le PSE peut être demandé par des institutions dé-

si-

rant obtenir l'accréditation, et qui veulent tout d'abord avoir une pré-évaluation de leurs programmes d'utilisation et de soins des animaux. Dans ce cas, cette évaluation sera réalisée par le(s) directeur(s) supérieur(s) d'AAALAC et des anciens membres du COA, indépendamment du futur processus d'accréditation réalisé par les membres du COA. Au cours de l'année 2010, une PSE a été réalisée en Europe.

#### **Représentation Internationale**

AAALAC est représentée de différentes manières à de nombreux congrès nationaux ou internationaux sur les sciences de l'animal de laboratoire, des cours ou des ateliers à travers l'Europe : en participant à des séminaires, en avant un stand dans les expositions, ou en combinant ces 2 types de représentation. Par exemple, AAA-LAC a participé cette année pour la troisième fois consécutive à l'exposition AFSTAL. Des présentations ont aussi été données lors d'autres congrès scientifiques, tel que le "2010 Transgenic Technology meeting" à Berlin et le "2010 IUTOX Meeting" à Barcelone, pour essayer de tisser des

liens entre la communauté des sciences de l'animal de laboratoire et les autres disciplines scientifiques.

La participation d'AAALAC a été particulièrement importante lors du dernier congrès FELASA à Helsinki où plusieurs présentations eurent lieu dans le cadre du programme scientifigue : l'amélioration des programmes d'utilisation et de soins des animaux grâce aux revues AAALAC, l'accréditation AAALAC du point d'une institution universitaire, et l'accréditation AAALAC des programmes asiatiques. II y avait un stand AAALAC dans la zone d'exposition, et également un séminaire d'orientation pour les "ad hoc specialists" européens.

La commission européenne a pris en compte AAALAC lors de la création du groupe de travail chargé d'établir le classement éthique des procédures. Un membre du COA représentait AAA-LAC à ce groupe de travail, dont les recommandations ont servi de base à la révision de l'une des annexes de la Directive 86/609.

AAALAC a aussi été représentée à un autre groupe de travail soutenu par l'EFPIA et FELASA, et qui a établi les critères de l'étude de faisabilité de l'utilisation des F2 de primates non humains, demandée par la nouvelle Directive. Le but de cette initiative a été d'offrir à la Commission Européenne des conseils sur la façon de réaliser une telle étude.

#### Conférence européenne AAALAC

AAALAC International a organisé sa première conférence européenne le 4 mai à Rome (Italie). 125 professionnels de l'animal de laboratoire venus de 18 pays ont assisté à cette conférence. La discussion portait sur les approches utilisées pour réaliser une 25

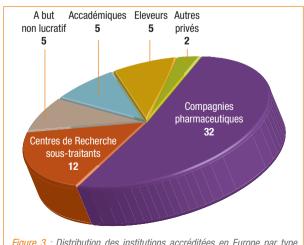


Figure 3 : Distribution des institutions accréditées en Europe par type d'activités

revue éthique, et les perspectives ont été partagées avec les représentants de 8 institutions accréditées AAALAC et un membre de la commission européenne. La conférence a aussi fourni une information liée à l'Hygiène, la Sécurité et la Santé au Travail, l'utilisation de référence par objectif/performance, et les tendances identifiées depuis les 6 dernières années de visites AAALAC à travers l'Europe.

Les présentations données pendant cette conférence sont toujours disponibles à la page web suivante : <a href="http://www.aaalac.org/resources/Europe/EuropeanConference Login.cfm">http://www.aaalac.org/resources/Europe/EuropeanConference Login.cfm</a>. Le login doit être demandé par email en contactant Dr. Javier Guillen à iquillen@AAALAC.org

Etant donné l'intérêt soulevé par cette première conférence européenne, il est dans l'intention d'AAALAC d'en organiser d'autres régulièrement, en essayant d'aborder le plus de sujets d'actualité des sciences de l'animal de laboratoire qui pourraient influencer le processus d'accréditation des institutions européennes.

#### **Publications**

La Newsletter de l'ESLAV inclut régulièrement une mise à jour des activités d'AAALAC en Europe. Cette communication est importante car elle facilite le transfert d'informations entre AAALAC et les adhérents de l'un des membres du conseil d'administration européen d'AAALAC. Un article a été publié dans le numéro de Février du journal LabAnimal, sur l'utilisation par AAALAC International de standards par objectif/performance, pour évaluer les revues éthiques dans les institutions européennes. L'article expliquait comment dans le contexte européen, où coexistent plusieurs approches différentes de la revue éthique, l'utilisation de standards par performance est indispensable pour évaluer comment elles fonctionnent en pratique. AAA-LAC peut accepter différentes facons de faire les choses, y compris en terme de revue éthique, en considérant toujours que le résultat final est bien défini et celui attendu.

# Providing Quality Purpose Bred Animals for Biomedical Research



Marshall BioResources is committed to the highest level of customer service and integrity.





BIORESOURCES



- Beagle Production in the United States, Europe and China
- Comprehensive Socialization and Enrichment Programs
- Dedicated to Flexible, Personalized Customer Service
- ISO-9001 Certified Quality Systems

#### Marshall BioResources

- North America +1 315.587.2295 infous@marshallbio.com
- AA Europe +33 4 72 56 98 60 infoeu@marshallbio.com
- Asia +86 84923662 infoch@marshallbio.com www.marshallbioresources.com

# Pourquoi on en voit de toutes les couleurs ...?

... une présentation simplifiée de la génétique de la pigmentation chez la souris, destinée à expliquer l'apparition de phénotypes inhabituels dans les progénitures de souris transgéniques.



crédit photo: JL Guénet

■ Jean-Louis Guénet¹

Fernando Benavides²

<sup>1</sup> <u>ilguenet@orange.fr</u> Chef de Service honoraire à l'Institut Pasteur à Paris

<sup>2</sup> fbenavid@mdanderson.org Professeur Agrégé au M.D. Anderson Cancer Center. Smithville. Texas USA Que ce soit pour obtenir un grand nombre d'embryons à un stade précoce du développement ou pour construire des chimères tétraparentales faciles à identifier dès la naissance, les techniques de production d'animaux génétiquement modifiés impliquent presque toujours le croisement de souris appartenant à des lignées consanguines différentes. La conséquence directe de ces croisements tous azimuts est que l'on voit très souvent apparaître dans la descendance des souris transgéniques, parfois à plusieurs générations d'écart, des variantes dans la coloration de la robe des animaux. Ce festival de couleur ne manque iamais d'impressionner les expérimentateurs qui, selon les cas, sont admiratifs d'un phénotype nouveau et séduisant ou au contraire soupconneux sur le degré de pureté des lignées utilisées. En effet, rien plus qu'une portée de souriceaux dans laquelle existent des variations de la pigmentation ne peut éveiller la curiosité ou la suspicion, surtout si apparaissent des couleurs inhabituelles et n'étant pas supposées exister chez les parents ....

Toutes ces variations de couleur résultent de l'action individuelle d'un petit nombre d'allèles aux locus impliqués dans le déterminisme de la pigmentation du pelage et traduisent, à leur manière, le passé "génétique" des individus observés. Nous allons essayer de faire une présentation simple de la situation, avec quelques exemples choisis de telle sorte que chacun retrouvera peut-être une situation vécue ... et, espérons-le, l'explication qui va avec.

# 1. – Les gènes qui gouvernent la pigmentation des rongeurs

La coloration du pelage des mammifères¹ est déterminée par cinq locus² majeurs désignés par les symboles A, B, C, D et P, par les généticiens du début du vingtième siècle (références 1 et 2)³. Dans l'ensemble des différentes lignées consanguines de souris (et de rat) de laboratoire, deux ou rarement trois formes alléliques différentes ont été identifiées à ces cinq locus et ce sont les combinaisons de ces diverses formes alléliques qui déterminent les variations de la couleur de la robe que l'on peut observer⁴. Au

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Ce que nous allons décrire à propos de la pigmentation chez la souris est valable pour la plupart des mammifères.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Pour le pluriel de *locus*, il est d'usage d'utiliser *locus* ou *loci*. Locus a néanmoins été recommandé par les rectifications orthographiques de 1990. Nous nous conformerons à ces recommandations dans cet article.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Parmi les généticiens du début du vingtième siècle deux plus que les autres méritent d'être mentionnés pour leurs travaux avec la souris comme modèle expérimental. Le premier est Lucien Cuénot, Professeur de Biologie animale à l'Université de Nancy, qui démontra dès 1902, que les lois de Mendel découvertes avec les pois étaient aussi applicables aux souris et par conséquent aux animaux. Pour cela il utilisa des "souris de compagnie", de pigmentation variée (souris blanches, jaunes, noires, tachetées, etc...) et retrouva dans la descendance des proportions mendéliennes classiques. Grâce à Cuénot et à ses travaux on peut dire que la génétique de la souris est née en France. Le second généticien est Clarence C. Little, le fondateur et premier Directeur du célèbre Jackson Laboratory, qui établit, à partir de 1909, la première lignée consanguine de souris (la lignée DBA) en associant, dans un même génome, les allèles récessifs de coloration : d, b et a.... la lignée DBA/2 est toujours très utilisée de nos jours.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Dans cet article, nous nous limiterons aux lignées consanguines de souris les plus fréquemment utilisées. La pigmentation du rat est gouvernée par les gènes homologues des gènes de la souris avec, en plus, un allèle (hooded - ho - lignée Long Evans et August) qui ne se rencontre pas dans les lignées consanguines de souris.



# atoire

# Performance et efficacité au quotidien

La société EHRET, constructeur d'équipements de laboratoire, crée un milieu de travail efficace. Les solutions proposées par EHRET répondent aux besoins de votre laboratoire.

- Technologies de salles blanches et systèmes de manutention, réalisant une protection maximale, confinement et soins d'animaleries en BSL 1 à 4, SPF et environnements gnotobiologiques.
- Systèmes de cages pour toutes espèces animales.
- Bancs de sécurité biologique classe II, enceintes à flux laminaires et technologies de salles blanches.
- Sas pour personnel et matériel.
- Chambres et machines à laver et de décontamination.
- Une société certifiée ISO la qualité produit est assurée.

EHRET propose une consultation spécialisée, design, planning/ingénierie, installation et maintenance/service dans tous les domaines d'animaleries scientifiques.





# EHRET LIFE SCIENCE SOLUTIONS

delà de ces cinq locus, d'autres gènes et un très grand nombre d'autres allèles ayant un effet sur la coloration du pelage (couleur proprement dite, intensité, reflets, tâches, brigeures<sup>5</sup>, etc.) ont été identifiés, en général sous forme de mutations survenues spontanément dans les élevages, mais ils ne se rencontrent pas dans les lignées majeures et nous n'en parlerons donc pas<sup>6</sup>.

Pour rendre les choses le plus simple possible, nous allons commencer par expliquer comment s'établit la pigmentation et à quel niveau les différents gènes exercent leur action. Il faudra simplement retenir que les allèles impliqués dans le déterminisme de la pigmentation, contrairement à beaucoup d'autres, sont toujours totalement exprimés. Pour rendre compte de cette caractéristique les généticiens disent que leur expressivité est complète. En termes simples cela veut dire, par exemple, que l'allèle "albinos", récessif, lorsqu'il est à l'état homozygote, entraîne toujours un phénotype blanc pur, avec œil rose, sans aucune variations d'intensité.

# 1.1. - Les mélanines à la base de tout

Les molécules de base de la pigmentation sont les mélanines. Ce sont des macromolécules biologiques produites par des cellules spécialisées de l'épiderme, les mélanocytes, stockées et transportées à pied d'œuvre dans des organites intracellulaires eux aussi spécialisés : les mélanosomes. Il existe deux types (principaux) de mélanine : l'eumélanine - un pigment noir/brun foncé - produit par condensation de monomères formés à partir de la tyrosine et la phæomélanine - un pigment jaune - produit par condensation de monomères à base de tyrosine et de cystéine. La synthèse des mélanines est relativement complexe et certaines étapes ne sont pas encore totalement élucidées. La molécule de départ est la tyrosine, qui est d'abord convertie en 3,4-dihydroxyphénylalanine ou DOPA, puis en DO-PAquinone. Ensuite, la synthèse de l'eumélanine ou de la phæomélanine dépend de la présence ou non de cvstéine. Pour se former, ces macromolécules ont donc besoin d'une enzyme activant l'oxydation de la tyrosine : c'est la tyrosinase.

Chez un mammifère normal, les deux formes de mélanines sont produites ensemble et sont réparties différemment selon les différents tissus. Dans l'œil, par exemple, il y a surtout de l'eumélanine et c'est pour cette raison qu'il apparaît presque toujours noir intense lorsque la souris est pigmentée. Dans le poil, par contre, les deux formes de mélanines sont produites et harmonieusement mélangées avec des variations génétiquement déterminées dont nous parlerons.

# 1.2. - Le gène de la tyrosinase et l'albinisme : être ou ne pas être ... (pigmenté) !

Lorsque le gène C (aujourd'hui symbolisé par *Tyr*, pour tyrosinase - chromosome 7)7 est inactif, les mélanines ne sont plus produites, c'est l'albinisme - la souris est uniformément blanche avec les veux rouges8. L'albinisme est une des plus vieilles mutations connues chez la souris et pratiquement toutes les lignées albinos de souris de laboratoire (A, AKR, BALB/c, FVB, SJL,...) ont le même allèle ancestral9. Ceci n'est d'ailleurs pas surprenant si l'on considère qu'une robe blanche est évidemment plus séduisante et convient mieux à un animal favori que le pelage sauvage, moins "clean". Les scientifiques ne s'en plaignent d'ailleurs pas non plus, tant il est vrai qu'il est plus facile de trouver une veine caudale, pour y faire une injection, sur une souris albinos que sur une souris pigmentée.

Les souris de certaines sous-lignées du groupe 129 (mais de certaines sous-lignées seulement) portent à la fois l'allèle albinos classique (c ou  $Tyr^c$ ) et un autre allèle au locus Tyr que l'on appelle chinchilla ( $c^{ch}$  ou  $Tyr^{ch}$ ) pour rappeler l'aspect du pelage des animaux mutants. Nous reviendrons sur ce point car les sous-lignées en question, qui sont très utilisées comme source de cellules embryonnaires totipotentes (cellules ES), por-

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Bandes ou rayures de poils foncés dans la robe – très évidentes chez le boxer "bringé".

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Le lecteur intéressé pourra consulter le site http://www.informatics.jax.org/ - puis commander "coat color". Il se verra retourner plusieurs centaines de génotypes .... Avec, heureusement, beaucoup de redondances.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Dans cet article, nous donnerons, dans tous les cas, les deux symboles correspondants aux locus impliqués dans la pigmentation : l'ancien, traditionnel et le moderne. Les deux écritures sont correctes tant qu'elles ne conduisent pas à des ambigüités. Mais il est vrai qu'il est plus rapide d'écrire c que Tyre.

<sup>8</sup> A vrai dire l'œil est, lui aussi, "non pigmenté" et c'est la couleur des vaisseaux sanguins qui, par transparence, lui confère la couleur "rouge". Ceci explique pourquoi l'œil change de couleur après le sacrifice des animaux albinos.

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> L'albinisme est également rencontré dans de nombreuses espèces de mammifères, homme compris, même s'il ne s'agit pas toujours de mutations au même locus *Tyr*.

tent aussi d'autres allèles ayant une influence sur la coloration.

L'allèle *Tvr*<sup>c</sup> masque les effets de tous les autres allèles impliqués dans la pigmentation (on dit qu'il est épistatique sur tous les autres gènes). Cela veut dire qu'une souris homozygote *Tyr*<sup>c</sup>/*Tyr*<sup>c</sup> apparaîtra albinos quel que soit l'assortiment d'allèles qu'elle peut avoir par ailleurs, dans son génome. Cette observation est importante car les allèles masqués par l'épistasie continuent néanmoins de ségréger en silence dans la population, pendant un nombre indéterminé de générations, et peuvent donc resurgir à tous moments et révéler leurs effets lorsqu'ils sont dans un contexte ou la tyrosinase est active. Un exemple de ce que nous venons de dire pourrait se trouver illustré en observant la descendance d'un croisement entre une souris "albinos" d'un stock non consanguin (par exemple CF1, NMRI, OF1, Swiss, etc..) et une souris noire de lignée C57BL/6 dans laquelle il ne faudrait pas être surpris de trouver deux couleurs de robe : le gris (agouti) et le noir (non-agouti)!

Les mutations spontanées au locus *Tyr* sont rarissimes (taux inférieur à 10-6 par gamète). Il en existe néanmoins toute une collection, dans des fonds génétiques très variés (ce sont des lignées co-isogéniques¹0), qui peuvent se révéler très utiles. Ainsi, on peut créer au laboratoire des chimères tétraparentales albinos ↔ pigmentées en injectant dans la cavité d'un blastocyste C57BL/6 - *Tyrc/Tyrc* (albinos) des cellules ES génétiquement modifiées provenant de souris

C57BL/6 *Tyr*<sup>+</sup>/*Tyr*<sup>+</sup> normalement pigmentées. Ceci présente l'avantage de travailler dans un fonds génétiquement uniforme tout en permettant de reconnaître très facilement l'origine des cellules ayant participé à la constitution de la chimère.

#### 1.3. - Le gène Agouti Pour un harmonieux mélange des genres (... de mélanines!)

Le gène *agouti* a été dénommé ainsi parce que ses effets sur la pigmentation confèrent aux animaux une robe qui les fait ressembler au rongeur sud-américain agouti (ou acouchi). Le symbole générique est A (chromosome 2) et le gène possède un très grand nombre d'allèles. Dans les lignées de souris de laboratoire les plus communes seuls trois allèles sont présents : A l'allèle sauvage, a (nonagouti) un allèle récessif et Aw (light bellied agouti ou white bellied agouti) l'allèle le plus dominant des trois, présent seulement dans les lignées 129. Le locus agouti gouverne la répartition de la mélanine dans le poil et dans certains autres organes ou tissus. Dans un poil d'une souris de phénotype sauvage, celui d'une souris C3H ou CBA par exemple, il existe trois zones : une zone basale, noire ou très foncée, colorée principalement par l'eumélanine, une zone apicale, de même couleur que la zone basale et pour finir une bande subapicale ou intermédiaire, de couleur jaune et colorée surtout par la phæomélanine (Figure 1). Pour percevoir les effets des allèles A et a au niveau du pelage, il suffit de souffler à rebrousse poil dans

la toison d'une souris C3H ou CBA et de faire la même chose dans la toison d'une souris de lignée C57BL/6 : on découvrira alors l'illustration de la description que nous venons de faire : un poil uniformément pigmenté de noir chez la souris C57BL/6 et trois bandes chez la souris C3H. C'est très clair ...! (Figure 1)Un petit coup de ciseau dans la toison serait encore plus démonstratif puisqu'il laisserait une marque pendant quelques jours chez la souris C3H (la bande apicale étant éliminée) mais pas de marque chez la souris C57BL/6. Essayez ...!

L'allèle  $A^w$ , se trouve dans toutes les sous-lignées du groupe 129. Ses effets sont les mêmes que ceux du locus A pour la toison dorsale, par contre la couleur du ventre des animaux est notablement éclaircie tirant tantôt sur le jaune tantôt carrément sur le blanc. Les effets de l'allèle  $A^w$  ne sont perceptibles, bien sûr, que chez les souris du groupe 129S1 à 129S8 qui ne sont pas albinos ou chinchilla par ailleurs<sup>11</sup>.

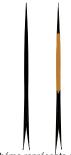


Figure 1: Le schéma représente deux poils prélevés dans la région dorsale d'une souris. Le poil "sauvage" (à droite), est celui d'une souris agouti (CBA ou C3H par exemple). Il possède une bande sub-apicale de phæomelanine alors que l'extrémité (l'apex) et la base sont noirs (eumélanine). Le poil non-agouti (à gauche) est entièrement noir (eumélanine).

<sup>10</sup> Ces lignées co-isogéniques sont très nombreuses et résultent toujours de mutations survenues dans une lignée consanguine et élevée à part. Dans ce cas un seul locus diffère entre les deux lignées qui peuvent être importées si besoin est du conservatoire du Jackson Laboratory - http://jaxmice.jax.org/

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Pour une explication relative aux génotypes des différentes sous-lignées 129 il est recommandé au lecteur de se reporter au site : <a href="http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strain\_129.shtml">http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strain\_129.shtml</a>

Le gène Agouti est un petit gène (18kb - quatre exons, dont trois codants). Lorsque la mutation non agouti (a), que l'on observe dans les lignées consanguines de laboratoire C57BL/6, C57BL/10 ou NZB entre autres, se trouve à l'état isolé (c'est-à-dire hors de l'influence d'aucun autre allèle) : la souris est toute noire poil et œil compris et c'est à peine si l'on peut voir, sur le ventre des animaux, à la rencontre des toisons dorsales et ventrales, et dans le pavillon de l'oreille, quelques poils jaunes.

Cet allèle a, non agouti, qualifié d'historique, est la conséquence de l'insertion d'un ADN d'origine virale (pour les spécialistes, il s'agit d'une insertion, de type VL30 de 5.5kb, dans le premier intron du gène). L'insertion a provoqué un remaniement de la séquence d'ADN empêchant la transcription correcte du gène (l'ARN transcrit est plus court et huit fois moins abondant chez la souris mutante a/a que chez la souris normale). Cependant, il n'est pas rare que l'insertion se détache de son contexte génomique, le gène peut alors, dans certains cas, reverser vers une forme fonctionnelle et l'on voit alors apparaître une souris Agouti  $(A^m/a)$  dans une portée de souriceaux noirs. Impressionnant vraiment! Nous avons observé, par deux fois, un tel événement dans notre laboratoire et nous avons pu confirmer qu'il s'agissait bien d'une mutation réverse et pas d'une toujours redoutée contamination génétique. Ici encore, une souris C57BL/6-A<sup>m</sup> co-isogénique peut avoir un intérêt pour marquer un lignage cellulaire particulier.

# 1.4. - Le gène dilute : une question d'organisation (... des molécules de mélanines !)

Le gène dilute (chromosome 9 - symbole ancien d - devenu Myo5a une fois le gène identifié au niveau moléculaire) dilue la couleur de la robe. A l'origine, cette mutation était connue sous le nom de *dilution maltese* pour rappeler la robe de certains chats de l'île de Malte. Le phénotype de dilution est dû à l'agglutination des grains de mélanine en grains plus gros et plus irréguliers ce qui, vu à l'échelon macroscopique, donne l'impression d'un éclaircissement de la pigmentation. Beaucoup d'allèles ont été identifiés au locus dilute, certains s'accompagnent de manifestations pathologiques avec des effets neurologiques ou des effets sur le système immunitaire<sup>12</sup>. L'allèle dilute qui ségrége dans les lignées de laboratoire (essentiellement les lignées DBA/1 et DBA/2) n'a d'effets que sur la pigmentation. lci encore, comme dans le cas de la mutation non agouti (a) décrite plus haut, la mutation dilute originale est due à l'intégration d'un virus oncogène écotropique (pour les spécialistes, il s'agit d'un ecotropic murine leukemia virus - Emv3). Le virus est inséré dans une région d'ADN non codant et les réversions sont bien moins fréquentes que celles du locus A. La mutation dilute ancestrale (*Myo5a*°) est, nous l'avons dit, à l'état homozygote dans la lignée DBA/2 mais, dans le génome des souris de cette lignée, elle n'est pas la seule mutation ayant une influence sur la pigmentation. Si les souris DBA/2 n'étaient pas "dilute" elles auraient une robe d'une couleur très proche de celle du chocolat (Figure 3). Chez ces souris, la pigmentation observée est la résultante de trois allèles récessifs : *a, b* que nous allons considérer ci-dessous et *d*. Contrairement à ce qui se passe pour les locus agouti et albinos, aucune lignée consanguine de souris n'est homozygote seulement pour la mutation *d* (*Myo5a*<sup>o</sup>)<sup>13</sup>.

#### 1.5. - Le gène brown : tout en demiteinte...

Les mutations au locus brown (chromosome 4 - symbole ancien b - devenu *Tyrp* pour *Tyrosinase related* protein) ont pour effet d'éclaircir l'eumélanine qui devient brune au lieu de noire à l'état sauvage. Il en résulte, ici encore, une dilution de tout le pelage mais cette dilution est de nature fondamentalement différente puisque, dans le cas de brown, elle est la conséquence d'une mélanine de couleur différente alors que pour dilute, elle est due, nous l'avons mentionné, à la compaction des pigments. La mutation brown (*Tyrp*<sup>b</sup>) est la même dans toutes les lignées de laboratoire où elle est fixée à l'état homozygote : il s'agit de l'allèle ancestral. Dans ces lignées, et comme pour dilute, elle n'est pas seule mais au contraire associée soit à l'albinisme (c) (A, BALB/c, ...) et dans ce cas on ne perçoit pas ses effets (épistasie), soit à non agouti (a) et dilute (d) (DBA/1 et DBA/2).

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> La maladie de Griscelli de l'homme, ou Chediak-Higashi-like syndrome, OMIM 214450, est une maladie immunitaire très grave mais heureusement rare, dont un allèle de la série dilute est le modèle parfait chez la souris.

<sup>13</sup> Chez la souris, il existe une autre mutation, leaden (In - Chr1) dont les effets sont strictement analogues à ceux de dilute. La lignée C57L est homozygote pour cette mutation (et pour a, comme toutes les souris consanguines du groupe C57).

# 1.6. - Le gène pink-eyed : la vie en rose ...

La mutation pink-eyed dilution (chromosome 7 - symbole ancien p - devenu Oca2 - pour oculocutaneous albinism II) dilue elle aussi la couleur de la robe, lci encore, ce locus comporte de très nombreux allèles ayant un effet plus ou moins prononcé sur la pigmentation du pelage et de l'œil. Si l'on se réfère aux estampes japonaises traitant du sujet, la mutation pink-eyed dilution est connue depuis les temps les plus reculés. Elle confère aux yeux des animaux homozygotes une très belle coloration rose rubis (et non pas rouge comme dans le cas de l'albinisme Tvrc) et c'est très probablement pour cette raison qu'elle a fait partie des allèles sélectionnés par les collectionneurs de "pet animals". Le pelage des souris Oca2º/Oca2º est dilué assez sensiblement et on observe que la dilution est essentiellement due à une diminution de synthèse de l'eumélanine tandis que la synthèse de la phæomélanine se maintient à un niveau quasi normal. Les allèles récessifs au locus P sont très peu représentés dans la panoplie des lignées de laboratoire (SJL et 129/J seulement) et, dans les deux cas leurs effets sont masqués par une interaction épistatique avec l'allèle albinos Tyrc. Les souris de génotype a/a; p/p - a/a; d/d; p/p ou a/a; b/b; p/p; que l'on rencontre assez fréquemment sur les marchés aux fleurs ont parfois des noms romantiques "lilas" - "champagne" - "bleue" - "café au lait" etc... leur rareté (qui va de pair avec le plus grand nombre d'allèles récessif à l'état homozygote) contribue à faire monter le prix !

Pour conclure avec le locus pink eyed dilution - *Oca2*°, il faut savoir qu'il est porté par le même chromosome 7 que le locus *Tyrc*. Dans la plupart des cas, nous l'avons dit, les souris qui sont *Oca2*°/*Oca2*° sont aussi *Tyrc* / *Tyrc*, elles sont albinos, et par conséquent cela n'attire l'attention de personne jusqu'au jour où se produit une recombinaison¹⁴ entre les deux locus *Oca2*° et *Tyrc* car c'est à ce moment-là qu'apparaît un phénotype totalement inattendu ... nous en reparlerons!

Après cette description analytique de l'effet des cinq locus majoritairement impliqués dans la pigmentation, nous allons à présent décrire le génotype des différentes lignées consanguines. Munis de ces renseignements fondamentaux nous pourrons alors prédire ce à quoi on peut s'attendre dans la descendance d'un croisement entre deux de ces lignées ou, inversement, nous pourrons reconstituer la généalogie la plus vraisemblable à partir des robes observées dans une progéniture.

# 2. - Le génotype des quatorze principales lignées consanguines de souris

Le tableau 1 présente, de manière synoptique, le génotype des quatorze principales lignées consanguines de souris pour chacun des cinq locus majeur de la pigmentation. Sur ce tableau, il faut remarquer que la lignée 129/J présente la particularité rarissime (et à vrai dire paradoxale) de ségréger pour deux allèles (c et c<sup>ch</sup>) au locus Tyr. Cette particularité a une explication historique si l'on se souvient que la lignée 129/J a été utilisée par Leroy C. Stevens pour mettre au point les transplantations d'ovaires chez la souris. Leroy Stevens, en effet, greffait des ovaires de souris de génotype *c/c* dans les bourses ovarigues de souris de génotype  $c^{ch}/c^{ch}$ , ayant une robe bien plus foncée et pouvait ainsi savoir, d'un seul coup d'œil<sup>15</sup> et après accouplement avec un mâle c/c, si l'embryon produit dérivait du greffon ou d'un reliquat d'ovaire de l'hôte ayant servi de "porte greffe" .... Le fait que les souris de la lignée 129/J soient totalement consanguines bien que ségrégeant pour deux allèles différents au locus Tyr, garantissait a priori une totale histocompatibilité entre le greffon et la souris receveuse et permettait donc d'évaluer la technique de la greffe per se sans obscurcir le tableau par des problèmes de reiet immunitaire. Astucieux ... non? Le tableau 2 donne le génotype des F1 qui pourraient naître des croisements interlignées s'ils étaient réalisés effectivement. Les F1 notés en gras sont les plus utilisés pour des raisons pratiques... ou commerciales! Jusqu'ici, les choses ont donc été simples et elles le resteront (autrement dit, on aura aucune surprise) tant que l'on se bornera à faire des croisements simples et directs, c'està-dire entre lignées pures. Par contre, dès que l'on va croiser des F1 les choses vont se compliquer beaucoup car les allèles récessifs de coloration vont s'exprimer dans la descendance et ceci en fonction d'associations se faisant au hasard ... le feu d'artifice va commencer! Nous allons prendre

<sup>14</sup> Les deux locus étant distants de 20 centiMorgans environ, un gamète sur cinq seulement est recombinant. Etant donné que les effets d'Oca2<sup>p</sup> sur la pigmentation de la robe ne seront perçus que lorsque l'haplotype recombinant sera à homozygote pour Oca2<sup>p</sup> on conçoit que cela puisse prendre plusieurs générations .... d'où la surprise!

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> Un œil, même peu exercé, reconnaîtra facilement les trois génotypes  $c/c - c/c^{ch}$  et  $c^{ch}/c^{ch}$ .

Lignées	Locus A	Locus B	Locus C	Locus D	Locus P	Robe	
129S1 à S8	$A^w/A^w$	B/B	C/C	D/D	P/P	Light belied Agouti	
129P1, P2, P3	$A^w/A^w$	B/B	Cch/C	D/D	p/p	Blanc crème œil rubis	
129T1 et T2	$A^w/A^w$	B/B	Cch/C	D/D	P/P	Gris chinchilla	
А	a/a	b/b	c/c	D/D	P/P	Albinos	
AKR	a/a	B/B	c/c	D/D	P/P	Albinos	
BALB/c	A/A	b/b	c/c	D/D	P/P	Albinos	
C3H	A/A	B/B	C/C	D/D	P/P	Agouti	
C57BL/10	a/a	B/B	C/C	D/D	P/P	Noire	
C57BL/6	a/a	B/B	C/C	D/D	P/P	Noire	
CBA	A/A	B/B	C/C	D/D	P/P	Agouti	
DBA/1	a/a	b/b	C/C	d/d	P/P	Chocolat au lait	
DBA/2	a/a	b/b	C/C	d/d	P/P	Chocolat au lait	
FVB	A/A	B/B	c/c	D/D	P/P	Albinos	
NZB	a/a	B/B	C/C	D/D	P/P	Noire	
SJL	A/A	B/B	c/c	D/D	p/p	Albinos	

Tableau 1 : Présentation synoptique du génotype des quatorze principales lignées consanguines de souris pour chacun des cinq locus majeur de la pigmentation.

Le locus A est porté par le chromosome 2 - le locus B par le chromosome 4 - les locus C et P sont sur le même chromosome 7 à 20 cM d'intervalle - le locus D est sur le chromosome 9. Tous ces locus ont une nomenclature officielle définie dans le texte.

Lignées	129S1 à S8	129P1 à P3	A	AKR	BALB/c	C3H ou CBA	C57BL/6 ou C57BL/10	DBA/1 ou DBA/2	FVB	NZB	SJL
129S1 à S8	-										
129P1 à P3	Light belied Agouti	-									
А	Light belied Agouti	Blanc crème ou blanc *	-								
AKR	Light belied Agouti	Blanc crème ou blanc *	Albinos	-							
BALB/c	Light belied Agouti	Blanc crème ou blanc *	Albinos	Albinos	-						
СЗН	Light belied Agouti	Light belied Agouti	Agouti	Agouti	Agouti	-					
C57BL/10	Light belied Agouti	Light belied Agouti	Noire	Noire	Agouti	Agouti	-				
C57BL/6	Light belied Agouti	Light belied Agouti	Noire	Noire	Agouti	Agouti	Noire				
CBA	Light belied Agouti	Light belied Agouti	Agouti	Agouti	Agouti	Agouti	Agouti	Agouti			
DBA/1	Light belied Agouti	Light belied Agouti	Chocolat	Noire	Brown	Agouti	Noire	Chocolat au lait	Agouti		
DBA/2	Light belied Agouti	Light belied Agouti	Chocolat	Noire	Brown	Agouti	Noire	Chocolat au lait	Agouti	Noire	
FVB	Light belied Agouti	Blanc crème ou blanc *	Albinos	Albinos	Albinos	Agouti	Agouti	Agouti	-	Agouti	Albinos
NZB	Light belied Agouti	Light belied Agouti	Noire	Noire	Agouti	Agouti	Noire	Noire	Agouti	-	Agouti
SJL	Light belied Agouti	Blanc crème ou blanc *	Albinos	Albinos	Albinos	Agouti	Agouti	Agouti	Albinos	Agouti	-

deux exemples qui correspondent à des situations concrètes, communes et assez fréquentes.

# 3. - Deux exemples pour illustrer le propos

# 3.1. - Premier exemple : la production de souris transgéniques par injection *in ovo* d'ADNs linéarisés : du classique !

Dans de nombreux cas l'expérimentateur induit la super ovulation chez des souris femelles impubères hybrides entre C57B/6 et SJL (autrement dit B6SJF1, si la mère de ces F1 est de la lignée C57BL/6) ou C57BL/6 et DBA/2 (autrement dit B6D2F1). Il les accouple ensuite avec des mâles C57BL/6 (par exemple) et récolte de beaux œufs stade 1 dans les pronucleus desquels il injecte l'ADN linéarisé et retrouve finalement un pourcentage assez élevé de nouveau-nés transgéniques. L'expérience est un succès. Mais à partir de maintenant il faut savoir que les nouveau-nés transgéniques ségrègent pour les allèles A/a au locus A, C/c au locus de l'albinisme et *P/p* au locus pink-eyed dilution, si les petites femelles F1 étaient B6SJF1 - ou qu'ils ségrègent pour les allèles B/b au locus B, D/d au locus dilute, si les petites femelles F1 étaient B6D2F1 - et que ces allèles risquent bien de "ressortir" un jour au hasard des croisements ..... et ceci à plusieurs générations d'écart. Si les souris transgéniques une fois reconnues, testées, caractérisées et estimées convenables au regard de l'expression du transgène, sont croisées systématiquement avec des souris de lignées pures (des souris de lignées C57BL/6 par exemple ou C3H) aucune surprise n'est à attendre : passée la deuxième génération, les souris à venir seront toujours de la couleur de la lignée choisie pour constituer le fonds génétique (noire dans le cas de C57BL/6). Par contre, si ce sont des frères ou des sœurs des transgéniques qui sont croisés entre eux pour assurer la propagation du transgène, alors, il ne faudra pas être surpris de retrouver, plus tard, un allèle de coloration à l'état homozygote qui donnera un phénotype inhabituel : par exemple une souris de couleur chocolat (a/a, b/b ...) ou gris acier (a/a, d/d ...) ou ... des couleurs qui n'existent pas dans les lignées parentales. Cette situation est une des plus classiques, elle se produit souvent lorsque la lignée transgénique est importée d'un autre laboratoire, sous la forme de géniteurs ayant une robe "classique" et que, brutalement, un phénotype inattendu apparaît.

# 3.2. - Deuxième exemple : la production de souris génétiquement modifiées à partir de cellules souches embryonnaires (cellules ES)

Les cellules embryonnaires utilisées par les généticiens pour l'invalidation de gènes (knockout), ou pour d'autres manipulations plus complexes du génome, sont issues d'un petit nombre des lignées consanguines seulement. A l'origine, il n'existait de cellules ES que de la lignée 129 (129/Sv ou 129/J) depuis, d'autres lignées ont été établies (C3H, BALB/c, C57BL/6, etc ...). Si l'on souhaite que ces lignées cellulaires, maintenues et manipulées in vitro, se matérialisent dans un organisme vivant autonome (c'està-dire une souris), il faut qu'elles participent, d'abord, à la formation d'une chimère allophénique tétraparentale – autrement dit à la formation d'une

souris produite par agrégation d'un embryon normal avec les cellules ES génétiquement modifiées – et que ces cellules ES en question participent à la formation de la lignée germinale de la chimère. Pour repérer facilement les animaux chimériques puis l'origine des embryons nés de cette chimère (cellules ES ou embryon normal), les généticiens choisissent en général d'associer aux cellules ES un embryon de phénotype très différent qui permet la reconnaissance rapide du chimérisme sans se soucier des autres allèles de coloration du pelage. Malheureusement, même si tous les croisements et toutes les manipulations sont soigneusement consignés dans les cahiers de laboratoire, il est clair qu'il peut y avoir dans la chimère un mélange assez complexe d'allèles de coloration et que tout cela ne demande qu'à s'exprimer un jour ou l'autre au hasard des croisements à venir. L'affaire se complique assez souvent lorsqu'une souris porteuse d'un allèle knock-out est importée dans un laboratoire nouveau, avec une fiche génétique très abondamment documentée en ce qui concerne la technique du knock-out, mais où rien n'est expliqué au sujet des croisements avant servi à produire le spécimen importé et c'est évidemment dans ce cas qu'apparaissent des phénotypes inattendus. Dans ce cas classique, le "knockout" est le centre d'intérêt majeur, le fonds génétique n'est pas pris en compte : un arbre cache la forêt!

# 4. – Quelques conseils... en guise de conclusion !

L'observation d'un phénotype nouveau et inhabituel dans la descendance d'une souris transgénique n'a

bien souvent rien de surprenant et encore moins d'inquiétant. Il s'agit, dans la plupart des cas, de la résurgence d'un allèle récessif impliqué dans le déterminisme de la coloration du pelage, provenant d'une lignée consanguine traditionnelle et qui pré-existait sous forme cryptique depuis un nombre indéterminé (qui peut être très grand) de générations (Figure 3). Un pédigrée complet et bien documenté permettrait sans doute de conforter l'hypothèse d'un tel allèle "auto-stoppeur" et quelques PCR judicieusement choisies permettront de tirer l'affaire au clair puisque la structure moléculaire de tous les allèles de pigmentation, aux cinq locus majeurs, est maintenant parfaitement connue.

Dans la routine de l'entretien d'une lignée transgénique, le tri "sélectif" des phénotypes qui apparaissent à chaque génération et l'élimination systématique de certains d'entre eux peut se révéler d'une efficacité très différente selon les allèles. Par exemple, l'élimination systématique des souris albinos dans les progénitures successives d'une lignée transgénique ne garantit pas contre des résurgences ultérieures du même phénotype alors qu'au contraire, la sélection de deux géniteurs albinos éteint définitivement la possibilité de résurgence d'allèle non albinos.

Un expérimentateur qui le souhaiterait vraiment pourrait connaître de manière précise, au prix de quelques PCR ou de quelques typages à l'aide de "SNPs", la structure génétique et les composantes principales de la lignée transgénique qu'il vient d'importer. Mais s'il est certain que cela aura un coût non négligeable, il n'est pas sûr que cela présente un intérêt maieur

pour l'expérience qu'il veut faire ...! Parvenu à la fin de cette petite revue sur la pigmentation de la robe chez la souris nous pouvons tirer trois conclusions importantes :

> L'observation de variations dans la coloration de la robe dans les progénitures des lignées transgéniques est assez banale. Il s'agit, dans la plupart des cas, de la résurgence d'allèles récessifs aux locus A, Tyr ou Oca2, plus rarement Tyrp ou Myo5a, mis fortuitement à l'état homozygote à la suite des croisements réalisés en amont. L'observation de phénotypes "pink-eyed dilution", un allèle rare dans les lignées consanguines traditionnelles, est souvent la conséquence du choix de certaines lignées de cellules ES utilisées pour l'étape in vitro de la manipulation génétique, plus rarement de l'utilisation d'un hybride impliquant la lignée SJL.

> II faut recommander, avec insistance, à tous les importateurs/utilisateurs de lignées transgéniques de se renseigner sur les pédigrées des souris importées (origine du fonds génétique et croisements effectués en amont de l'expédition) et pas seulement sur la nature de la manipulation génétique et/ou le phénotype observé. > Indépendamment de ce que pourra être la réponse apportée à cette question, il faut choisir un fonds génétique et commencer sans tarder la création d'une lignée congénique (speed congenic par exemple) pour le transgène importé. Nous avons abordé cet important sujet dans un numéro antérieur de cette revue (Guénet J-L. & Benavides F., STAL, vol 35, pp 45-54, 2009). Il faut savoir que le choix d'un fonds génétique est une démarche qui peut avoir des conséquences très importante sur l'expression du transgène et que rien ne peut permettre de formuler la moindre prédiction en cette matière. Hélas, il n'y a pas de fonds génétique universel...

Les lecteurs désireux d'en savoir plus long sur la génétique de la coloration de la robe chez la souris pourront avantageusement se référer au Livre intitulé "*The Coat Colors of Mice*" de Willys K. Silvers — Springer Verlag 1979 en accès libre sur le site de Mouse Genome Informatics <a href="http://www.informatics.jax.org/wksil-vers/index.shtml">http://www.informatics.jax.org/wksil-vers/index.shtml</a>.

#### Références bibliographiques

Castle, W.E. & C.C. Little. The peculiar inheritance of pink eyes among colored mice. Science. 30, 313–314 (1909).

Cuénot, L. La loi de Mendel et l'hérédité de la pigmentation chez les souris. Arch. Zool. Exp. Gen. 3, 27–30 (1902).

Linder, C.C. & M.T. Davisson. Historical foundations, in The Laboratory Mouse. Hedrich HJ (ed). Elsevier, London. pp. 15–24 (2004).

Searle A.G. Comparative Genetics of Coat Colour in Mammals. Academic Press (1968).

Staats, J. "The Laboratory Mouse," in Biology of the Laboratory Mouse. Dover Publications, Inc. NY. pp. 1. (1968).



Figure 2: La pigmentation de cette souris est presque exclusivement composée de phæomélanine, la mélanine jaune. L'eumélanine, la mélanine noire, n'est cependant pas absente puisque l'œil est intensément noir. Le gène Agouti règle la répartition des deux pigments mélaniques. Ici, nous sommes dans un cas extrême – la souris est hétérozygote pour l'allèle yellow (A<sup>y</sup>) létal à l'état homozygote. A l'autre extrémité de la "gamme" il y aurait l'allèle a<sup>e</sup> – extreme non agouti, la souris serait alors entièrement noire.

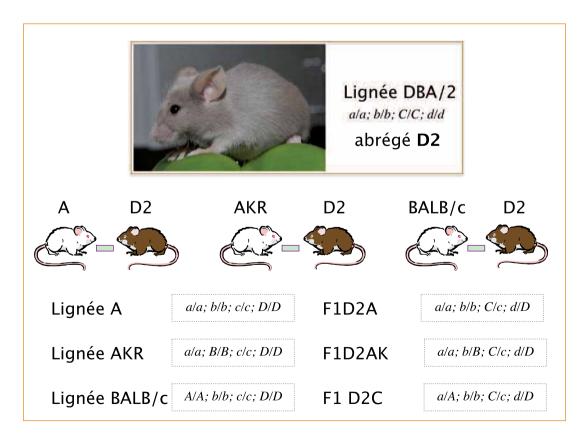


Figure 3: Lorsqu'on croise une souris DBA/2 (génotype a/a; b/b; C/C; d/d) avec une souris AKR (genotype a/a, B/B; c/c; D/D) on obtient des descendant homogène de couleur noire (a/a; b/B; C/c; d/D). Un croisement DBA/2 x A (a/a; b/b; c/c; D/D) donne au contraire des souris chocolat (a/a; b/b; C/c; d/D). Finalement, un croisement DBA/2 x BALB/c (A/A; b/b; c/c; D/D) donne des souris de couleur canelle (a/A; b/b; C/c; D/D). Ce schéma comporte deux messages : 1) il illustre la notion d'épistasie (les souris A, AKR et BALB/c sont uniformément albinos en dépit d'une constitution génétique différente) et 2) il montre que l'on peut tester simplement la pureté d'une lignée en analysant la pigmentation d'une progéniture F1 : une F1 doit toujours être entièrement homogène!



Souris de phénotype sauvage pour les cinq locus



Cette souris est homozygote pour la mutation non agouti a. La robe est intensément noire. La souris a cependant quelques poils jaunes dans les oreilles et sur le ventre.



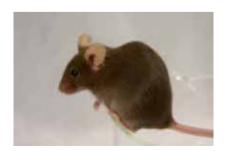
Cette souris est homozygote pour la mutation albinos c ou Tyr. La tyrosinase étant inactive, la souris ne produit aucune mélanine et la robe est totalement dépigmentée.



Cette souris est homozygote pour la mutation dilute d ou Myo5ad. Les pigments de mélanine ont tendance à se compacter donnant l'illusion d'une dilution.



Cette souris est homozygote pour la mutation pink eyed dilution p ou Oca2º. La dilution du pelage est essentiellement due à une diminution de synthèse de l'eumélanine tandis que la synthèse de la phæomélanine se maintient à un niveau quasi normal. Cette mutation est très ancienne, associée à d'autres mutations au trois autres locus A, B ou D, elle donne des phénotypes aux très belles couleurs. C'est une mutation très commune sur les "marchés aux fleurs" et dans les "pet shops".



Cette souris est homozygote pour la mutation non agouti a/a et brown b/b (ou Tyrpb/Tyrpb).

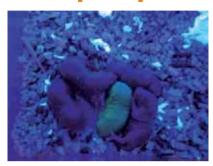


Les souris représentées sur cette image proviennent toutes les trois d'un F2 C57BL/6 x DBA/2. La souris sur le poivron rouge est a/a ; d/d (Myo5a<sup>d</sup>/Myo5a<sup>d</sup>), celle qui est sur le poivron vert est a/a ; b/b (Tyrpb/Tyrpb), celle qui est sur le poivron jaune est a/a.



Cette souris est homozygotes pour la mutation Tyrp<sup>b</sup>

### Souris lentigéniques : détermination du nombre de copies par QPCR



Crédit photo : PBES

■ Teixeira M.¹ Blanquier B.<sup>2</sup> Nègre D.<sup>2,3</sup> Ghittoni R.5 Szecsi J.3 Henry F.<sup>1</sup> Coupet CA.4 Aubert D.1 Cosset FL.3

Marvel J.4

- <sup>1</sup> Plateau PBES, AniRA, IFR128, ENS-Lyon 46 Allée d'Italie, Lyon, F-69364, France;
- <sup>2</sup> Plateau Analyse Génétique et Véctorologie, AniRA, IFR128, ENS-Lyon 46 Allée d'Italie, Lyon, F-69364, France;
- <sup>3</sup> INSERM, U758, ENS-Lyon 46 Allée d'Italie, Lyon, F-69364, France:
- 4 INSERM, U851, 21 Avenue Tony Garnier, Lyon, F-69007, France.

Contact: marie.teixeira@ens-lyon.fr

Jusqu'à présent, les souris transgéniques sur-exprimant un gène d'intérêt ont été obtenues principalement par injection d'un fragment d'ADN double brin. dans l'un des pronucléi de l'embryon au stade 1 cellule. Néanmoins, une autre méthode basée sur les vecteurs lentiviraux peut être utilisée. Elle présente une meilleure efficacité d'intégration de l'ADN dans le génome. Les animaux transgéniques obtenus par transgénèse lentivirale sont souvent porteurs de plusieurs copies du transgène, insérés dans des sites différents du génome. Il est important de caractériser précisément ces fondateurs (en particulier le nombre de copies du transgène inséré) afin de mieux choisir ceux qui permettront d'établir la lignée transgénique. Le but de ce travail est de fournir une méthode simple, rapide et universelle permettant de déterminer précisément le nombre de copies du transgène inséré dans le génome des fondateurs et de leurs descendants. Cette méthode présente également l'avantage d'être indépendante du transgène utilisé. Nous avons utilisé la PCR Quantitative (QPCR) pour déterminer le nombre de copies du vecteur lentiviral intégré. Les amorces choisies sont spécifiques des vecteurs dérivés de VIH (Virus de

l'Immunodéficience Humaine). Cette

méthode peut être utilisée aussi bien

sur un lysat de tissu que sur une pu-

rification d'ADN génomique. Deux

paires d'amorces ont été dessinées.

La première vise un gène de réfé-

rence cellulaire alors que la seconde

reconnaît une partie constante de la séquence des LTR (Long Terminal Repeat), régions promotrices de l'expression du génome viral.

Pour démontrer l'efficacité et la fiabilité de cette méthode, nous l'avons appliquée à des animaux transgéniques pour un transgène GFP (Green Fluorescent Protein) obtenus à l'aide d'un vecteur lentiviral dérivé du VIH. Ces animaux ont été parallèlement analysés par QPCR en utilisant des amorces GFP ou LTR-HIV. Trente-deux souris ont été testées. Deux fondateurs différents ainsi que leur descendance ont été analysés sur plus de 3 générations. La sensibilité de la technique QPCR qui permet de détecter moins d'une copie par cellule, démontre la mosaïcité des fondateurs. De plus, les résultats de quantification obtenus pour les séquences GFP ou LTR-HIV sont équivalents. De ce fait, cette technique est maintenant utilisée en routine dans notre structure pour caractériser les animaux transgéniques obtenus par lentigénèse.

Up until now transgenic mice were mainly obtained by DNA pronuclear microinjection. Another method based on lentiviral vectors is now used, providing better efficiency of DNA integration. Transgenic animals obtained by lentiviral transgenesis often carry several copies of the transgene, inserted in different sites of the genome. Moreover most founders obtained, even those with many integrated copies, are mosaics. Therefore, it is very important to fully characterize each founder in terms of copy numbers to choose the most suitable founder to establish the trangenic line. The aim of this work was to provide a general and simple method to determine the transgene copy number in the genome of founders and of their progeny. This method detects the vector backbone and hence is independent of the transgene used.

We used quantitative PCR (QPCR) to determine the number of copies of integrated lentiviral vector. Oligonucleotides used are specific for HIV (Human Immunodeficiency virus) based lentiviral vectors. This method uses genomic DNA prepared without extensive purification. Two pairs of primers were designed: the first one is used as a reference gene and the second one recognizes the LTR sequences of HIV to quantify the copy number.

To demonstrate efficiency and reliability of the results obtained, we applied our method to lentigenic animals carrying a GFP transgene. These animals were analysed by QPCR (primers in the GFP gene) and by the germline transmission rate obtained by breading each founders with wild type mice. Thirty-two mice were tested. Two different founders and their progeny over 3 generations were analysed. Results obtained by both methods were statistically coherent thus demonstrating the validity of our QPCR method. We now routinely use this method to determine copy numbers for all lentigenic animals produced in our facility.

#### Introduction

Les expériences de transgénèse se sont développées au cours des années 80 avec l'essor de la micro-injection et des cellules embryonnaires totipotentes. Depuis quelques années des vecteurs dérivés de lentivirus ont été développés afin, notamment, de répondre aux exigences de la thérapie génique (Pfeifer 2004). Les lentivecteurs utilisés sont intégratifs mais pas réplicatifs, et permettent de délivrer le transgène à la cellule ou à l'embryon qu'ils infectent de façon efficace et contrôlée. L'utilisation de ces vecteurs en transgénèse depuis une dizaine d'année a validé une nouvelle approche méthodologique applicable à de nombreuses espèces animales. La transmission germinale du fragment inséré a ainsi été démontrée chez la souris (Lois et al. 2002; Pfeifer et al. 2002), le rat (Lois et al. 2002), le poulet (McGrew et al. 2004), le porc (Hofmann et al. 2003; Whitelaw et al. 2004) et le bovin (Hoffman et al. 2004).

La membrane pellucide protège l'embryon des pathogènes et notamment des virus. L'infection des embryons par un lentivecteur nécessite donc une étape préalable de dé-pellucidation avant l'aiout des particules infectieuses dans le milieu de culture (Ikawa et al. 2003). Une autre solution est d'injecter la suspension lentivirale dans l'espace compris entre l'embryon et la membrane pellucide (Lois et al. 2000; Pfeifer et al. 2002). Cette injection se fait au stade 1 cellule. L'ensemble des cellules d'un individu provient de la cellule initiale mais les intégrations du lentivecteur peuvent se produire après la première division. Les cellules de cet individu sont différentes en terme de site d'intégration du lentivecteur et du nombre de copies insérées (Tenenhaus et al, 2007; Sauvain et al, 2008). Les animaux sont donc mosaïques

Au sein du PBES (Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris) nous avons développé cette technique de transgènèse lentivirale car elle présente l'avantage d'obtenir rapidement une grande quantité d'animaux transgéniques sur un fonds génétique défini. De plus, les fondateurs obtenus divergent par leur site d'intégration du transgène. Cela laisse la possibilité de sélectionner les fondateurs présentant les sites d'intégration les plus favorables à l'expression du transgène. Un inconvénient de cette méthode réside dans le fait que les animaux obtenus peuvent présenter un grand nombre de sites d'intégration du transgène dans leur génome. Le fondateur transmettra à sa descendance tout ou une partie de ces copies de facon aléatoire. Il est donc difficile d'obtenir une lignée stable génétiquement, lignée dont tous les individus présenteraient le même nombre de copies intégrées aux mêmes sites. Le moyen le plus sûr d'établir une lignée génétiquement stable est de partir de fondateurs présentant une seule intégration du transgène. Dans ce cas, les descendants transgéniques présenteront forcément la même intégration que le fondateur. Nous avons donc mis au point une méthode simple et rapide pour déterminer le nombre de copies de transgène pour chaque animal.

Jusqu'à présent le seul moyen de déterminer approximativement le nombre de copies était le Southernblot. Cette technique, beaucoup moins sensible et plus longue à mettre en œuvre que la PCR, permet en effet de 39

quantifier un faible nombre de copies à l'aide de sondes spécifiques.

La PCR Quantitative ou la PCR en temps réel est une réaction d'amplification par polymérase en chaîne (PCR) dont on va suivre le signal en temps réel grâce à un marqueur fluorescent. Il existe deux technologies de marquage fluorescent de l'ADN. Les sondes d'hybridation spécifiques de la cible, portant à leurs extrémités des fluorophores, permettent une mesure séquence spécifique de l'amplicon (sondes Tagman, Beacon etc.), alors que les marqueurs fluorescents du double brin ADN comme le SYBR® Green permettent la mesure de tous les produits d'amplification qu'ils soient spécifiques ou non de la cible étudiée. La spécificité et la qualité des amplicons sont alors analysées au cours d'une étape supplémentaire de la réaction de PCR qui est la dissociation des produits formés. Cette étape de dissociation permet la mesure du Tm (Melting Temperature) de l'amplicon qui est une mesure spécifique de la séquence et de la taille de l'amplicon d'intérêt.

Pour cette étude nous avons choisi de travailler avec la technologie SYBR® Green (sybr). Le sybr a la particularité de devenir fortement fluorescent lorsqu'il s'intercale dans le petit sillon de la double hélice : il permet donc de suivre le signal d'amplification de façon très sensible (1 molécule fluorescente toutes les 20 à 25 paires de bases). L'étape de dissociation des produits formés permet de vérifier la spécificité des amorces (Tm de l'amplicon) et la qualité des amorces (dimérisation etc.).

La quantité de fluorescence mesurée sera proportionnelle à la quantité d'ADN présente. Un seuil de détection sera positionné au-dessus du bruit de fond dans la phase exponentielle de la cinétique d'amplification. Le croisement de ce seuil sur la cinétique d'amplification dans la phase exponentielle s'appelle Cq ou Cycle de quantification. Le Cq est inversement proportionnel à la quantité d'ADN.

Afin de normaliser les résultats et éviter tous les biais techniques dus à la préparation ou à la conservation des échantillons, nous avons quantifié en même temps que les cibles GFP et LTR, un gène de référence cellulaire (CD8) présent systématiquement à deux copies par cellule. Nous avons choisi des amorces dans la région promotrice du gène. Grâce à cette normalisation il est possible de travailler soit sur de l'ADN génomique purifié soit directement sur le lysat cellulaire.

Pour mettre au point cette méthode et vérifier sa fiabilité nous avons procédé en trois temps.

Dans un premier temps nous avons choisi une lignée exprimant la GFP, obtenue par recombinaison homologue. Le nombre de copie du gène codant pour la GFP au stade homozygote est de 2 et de 1 copie à l'état hétérozygote. Ces animaux nous ont permis de mettre en place le protocole de QPCR pour la GFP.

Dans un second temps, en utilisant la technique lentigénèse, nous avons établi des lignées de souris contenant le gène GFP. Pour les fondateurs et leurs descendants, nous avons déterminé le nombre de copies de GFP par QPCR en utilisant des amorces spécifiques du transgène GFP.

Finalement, nous avons utilisé ces mêmes animaux afin de valider la détermination du nombre de copies en utilisant les amorces spécifiques des LTR-HIV. Ces amorces nous permettent donc de déterminer le nombre de copies par cellule de tous les animaux obtenus avec la technique lentigénique indépendamment du transgène d'intérêt.

#### **Matériel et Méthode**

#### Préparation de l'ADN

La préparation de l'ADN est réalisée par lyse alcaline à partir de prélèvements de tissu.

Un volume de 100 µl d'une solution NaOH 25 mM, EDTA 0.2 mM est ajouté au prélèvement de tissu Les tubes sont placés à 95 °C pendant 30 minutes, puis mélangés, et un volume de 100 µl de solution Tris HCl 40 mM, est ajouté. Après homogénéisation, le lysat est conservé à 4 °C jusqu'à 3 jours. L'ADN de chaque échantillon est dosé au nanodrop puis dilué dans l'eau afin d'obtenir approximativement 4 ng/µl d'ADN.

#### Les séquences d'amorce

Le gène CD8 est ubiquitaire et présent en une copie par génome haploïde. Une paire d'amorces spécifiques de la région promotrice CD8 a été dessinée pour la normalisation des échantillons Prom.CD8 sens : 5'-GGTGCATTCT-CACTCTGAGTTCC-3'

Prom.CD8 anti-sens : 5'-CAGACA-GAGCTGATTTCCTATGTG)-3'

La seconde paire d'oligonucléotides cible les gènes d'intérêt :

GFP sens :5'-ATGGTGAGCAAGGGC-GAGGA-3'

GFP anti-sens :5'-TCGCCGGA-CACGCTGAACT-3'

LTR-HIV sens : 5'-CCTCAA-TAAAGCTTGCCTTGA-3'

LTR-HIV antisens :5'-GGCGCCACTGC-TAGAGATTTT-3'

Les amorces ont été validées pour

leur spécificité (un seul produit d'amplification), leur efficacité de PCR et leur linéarité de détection.

Pour chaque échantillon testé, deux mélanges réactionnels sont préparés ; l'un contenant les amorces du promoteur CD8, l'autre les amorces GFP ou LTR-HIV.

#### Préparation du mélange réactionnel

Les amorces sont commandées à la société Invitrogen et préparées à une concentration de 10  $\mu$ M sous H<sub>2</sub>0. Les amorces sont diluées ensuite dans le MIX QPCR (kit commercialisé par Invitrogen, réf : 11744-500). Ce mélange réactionnel est préparé extemporanément. Chaque point de QPCR nécessite 15  $\mu$ l de mélange réactionnel auquel on ajoute 5 $\mu$ l de solution d'ADN à 4 ng/ $\mu$ l.

#### Détermination de l'efficacité pour une paire d'oligonucléotides

Au cours d'une PCR, si tous les brins matrices servent à donner une copie complète de l'amplicon, alors l'efficacité (notée E) de la PCR est de 2. Cela n'est pas toujours vrai. Par conséquent, il faudra déterminer, pour chaque paire d'oligonucléotides, cette valeur E. Pour cela l'ADN est amplifié par PCR. A partir de ce produit de PCR. 10 dilutions en cascade de 10 en 10 sont réalisées. Pour chaque dilution, une valeur de Cq est déterminée. Une régression linéaire du log de la concentration en fonction des Cg obtenus permet de calculer l'efficacité à partir de la pente de la droite obtenue. (E= 10<sup>-1/pente</sup>). Cette mesure d'efficacité permet de déterminer la linéarité et la limite de détection du couple d'amorces (fig.1) et sert en outre à standardiser notre système de quantification.

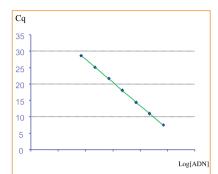


Fig 1: Détermination de l'efficacité des oligonucléotides Prom.CD8. : Régression linéaire des Cq obtenus en fonction du log de la concentration ADN. L'équation de la droite est y=-3.5438 + 41.773 (R²=0.999). E=10<sup>c-1/pente)</sup> par conséquent E= 1.9151

#### Préparation de la plaque de QPCR

Chaque plaque de 96 puits est préparée comme indiqué sur le schéma I. Chaque point est dupliqué. Sur cette plaque, sont déposés deux mélanges réactionnels contenant soit les amorces de référence (prom.CD8), soit les amorces spécifiques (LTR-HIV ou GFP). A ces mélanges, on ajoute ensuite 5 µl d'échantillons (F0-2, F0-3, F0-4). Sur chaque plaque, on dépose également un ou plusieurs contrôles internes dont on connaît le nombre de copies (G2-5F2, G2-10F2, G2-14F2), un échantillon ne contenant pas d'ADN ( $H_2O$ ) et un standard interne (S).

Les calculs de quantification se font en utilisant la correction d'efficacité et donc en utilisant l'efficacité réelle de chacun des couples d'amorces (Pffafl, 2001).

Pour chaque couple d'amorces il y a plusieurs contrôles :

1-Un ou deux point(s) standard(s) (S) issus de la gamme d'efficacité et préalablement aliquotés permettent de valider les résultats d'une plaque donnée et de comparer les plaques entre elles : les Cq ou nombre de copies de ces standards doivent être identiques à ceux obtenus dans la gamme.

2-Un contrôle négatif sans ADN (H<sub>2</sub>O) pour vérifier les contaminations (amplification en absence d'ADN).

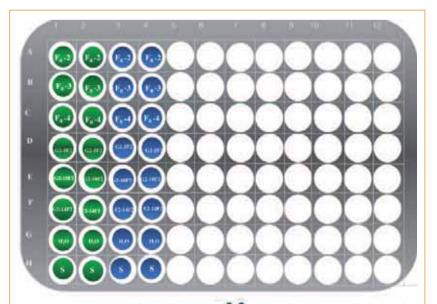


Schéma I : 15 µl de chaque Mélange Réactionnel : sont placés de la plaque QPCR. Un mélange contient les amorces de référence: PromCD8 (en vert), l'autre les amorces spécifiques du transgéne: LRT-HIV (en bleu). Puis 5 ul d'échantillons (F<sub>0</sub>-2, F<sub>0</sub>-3, F<sub>0</sub>-4. ...) sont déposés. De plus, on utilise plusieurs contrôles internes dont on connaît le nombre de copies: G2-5F2, G2-10F2, G2-14F2; un contrôle négatif (eau) et enfin un standard interne (S). Chaque détermination est en duplicate.





3- Des ADN issus de prélèvements d'animaux dont le nombre de copies GFP ou LTR-HIV est connu (G2-5F2, G2-10F2, G2-14F2). Ces échantillons pourront servir au calcul des nouveaux échantillons.

La quantification en parallèle du gène de référence prom.CD8 permet de normaliser les échantillons entre eux. Sur une même plaque il est impératif de placer plusieurs échantillons dont le nombre de copies est connu.

La table I décrit les étapes de calculs La colonne (1) indique le nom de l'échantillon. Chaque échantillon est dupliqué. La colonne (2) et (3) donne, pour chaque échantillon la moyenne des Cq lorsque l'on utilise les amorces prom.CD8 ou LTR-HIV respectivement. La colonne (3) et (5) affiche une quantité arbitraire des produits obtenus en utilisant les amorces prom.CD8 ou LTR-HIV respectivement. Cette quantité arbitraire est calculée de la manière suivante : E-cq.

La colonne (6) donne la Quantité Relative c'est à dire la quantité des produits, obtenus avec les amorces LTR-HIV, normalisée par la quantité des produits obtenus avec les amorces prom.CD8. Cette normalisation permet de tenir compte de la variabilité technique due à la préparation des échantillons.

La colonne (8) délivre le nombre de copies réel. Ce nombre est déterminé en tenant compte du nombre de copies des standards internes (G2-5F2, G2-10F2, G2-14F2).

#### Résultats.

1. Détermination du nombre de copies par QPCR en utilisant les amorces GFP

Nous avons réalisé une lyse alcaline sur l'ensemble des échantillons biologiques. Cette technique, peu coûteuse, permet d'obtenir rapidement (en 30 minutes) une préparation d'ADN. Comparée à l'ADN obtenu en utilisant des colonnes, cette préparation d'ADN nous a permis d'obtenir des résultats moins précis mais suffisamment reproductibles.

Nous avons analysé 44 échantillons provenant de souris obtenues par recombinaison homologue. A l'état homozygote, l'animal présente 2 copies, à l'état hétérozygote, 1 seule copie. Le nombre de copie mesuré est de 1.0 +/-0.1 (n=22) pour les hétérozygotes et

2.0 + - 0.3 (n=22) pour les homozygotes. Ces résultats montrent une excellente reproductibilité des expériences de QPCR. l'erreur sur la mesure étant en générale inférieur à 15 %. La figure 2 décrit les fondateurs obtenus après une micro-injection des embryons au stade 1 cellule. Le titre des lentivecteurs était de 6.4 108UI/ml. 74 embryons ont été transférés. Après gestation, on a obtenu 22 souris, dont 16 étaient positives. Le nombre de copies du gène codant pour la GFP varie de 0.25 copies à 50 copies par cellule.

	Prom.CD8 gene		LTR-HIV gene				
(1) échantillon	(2) Moyenne Cq	(3) Quantité (Efficacité) <sup>-cq</sup> X 10 <sup>8</sup>	(4) Moyenne Cq	(5) Quantité (Efficacité) <sup>-Cq</sup> X 10 <sup>8</sup>	(6) Quantité Relative (5)/(3)	(7) Number of copy	(8) Nombre de copi Réel
F0-2	24,035	16,502	24,79	3,459	0,21		1,09
F0-3	24,59	11,506	26,94	0,777	0,07		0,35
F0-4	24,13	15,514	27,42	0,559	0,04		0,19
G2-5F2	24,055	16,289	24,95	3,096	0,19	Connu (1 copie)	
G2-10F2	23,55	22,615	24,71	3,644	0,16	Connu (1 copie)	
G2-14F2	24,21	14,728	25,05	2,879	0,2	Connu (1 copie)	

Table I: Pour chaque échantillon (F0-2, F0-3 et F04), la moyenne des Cq (colonne 2 et 4). La quantité d'ADN est calculée en utilisant l'efficacité réelle des amorces. Cette efficacité est de 1.9151 pour Prom.CD8 (colonne 3) et de 2.00 pour les amorces LTR-HIV (colonne 5). Le calcul du nombre de copies réel tient compte de la quantité relative obtenu avec les amorces Prom.CD8 (colonne 3) et LTR-HIV (colonne 6) ainsi que des résultats obtenus avec des échantillons dont le nombre est connu (échantillon G2-5F2, G2-10F2 et G2-14F2).

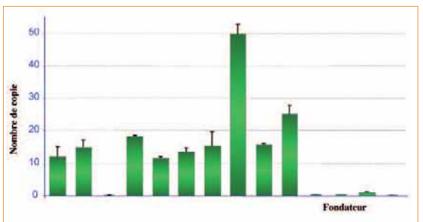


Figure 2 : Au cours d'une microinjection de lentivecteurs, on obtient un grand nombre de souris transgéniques. Les valeurs montrées sont la moyenne de 3 mesures indépendantes.

La technique de QPCR permet donc de mesurer un spectre de nombre de copies très large (de 0.25 copie à 50 copies par cellule). Les valeurs inférieures à 1 copie par cellule suggèrent la mosaïcité des souris F0 (Tenenhaus et al. 2007 ; Sauvain et al. 2008).

Les nombres de copies obtenus par QPCR ont ensuite été validés par la dénétique. Nous avons réalisé de nombreux croisements de fondateurs avec des souris sauvages et nous avons mesuré le nombre de descendants auquel le transgène est transmis. La figure 3 décrit les résultats obtenus. Si le nombre de copie intégrée dans le génome du fondateur est de 1, le pourcentage de F1 transgénique (positive pour le transgène) est de 50 %. Ce pourcentage chute à 25 % ou 12,5 % si le fondateur possède 0.5 ou 0,25 copie. La figure 4 reprend les résultats de QPCR pour 4 croisements distincts. La transmission des transgènes est de type Mendélien. Des fondateurs dont le nombre de copies est inférieur à 1 ont été croisés avec une souris sauvage. Les individus obtenus présentent un nombre de copies proche de 1 (> 0.8), ce qui confirme le statut mosaïque des FO. L'intégration des lentivecteurs injectés sous la membrane pellucide, peut s'effectuer tardivement aux stades 2 et 4 cellules du développement.

#### 2. détermination du nombre de copies par QPCR avec les amorces universelles LTR-HIV

La même méthode a été appliquée à la détermination du nombre de copies du transgène avec les oligonucléotides spécifique du LTR-HIV. Les résultats obtenus ont été comparés avec les précédents obtenus avec les

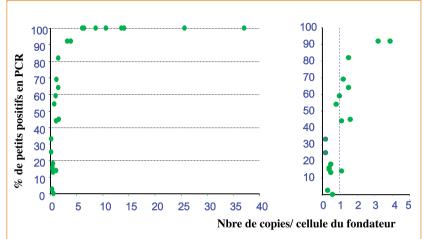


Figure 3 : Pourcentage de souris transgéniques F1 obtenu en fonction du nombre de copie du fondateur F0. L'accouplement effectué est F0 x souris sauvage. Le graphique de gauche est une résolution plus importante du graphique de droite.

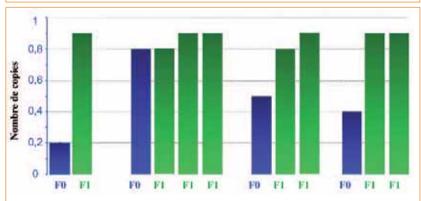


Figure 4 : Nombre de copies des souris en fonction de la génération des animaux. Les fondateurs apparaissent en bleu. On a procédé à un accouplement de ces fondateurs avec une souris sauvage. Sur cet histogramme seuls les petits F1 (en vert) transgéniques ont été représentés. Les F1 sauvages n'apparaissent pas sur cet histogramme.

oligonucléotides spécifiques de la GFP. Les résultats sont similaires (figure 5). Ces oligonucléotides LTR-HIV sont maintenant utilisés en routine au PBES pour quantifier les animaux lentigèniques obtenus quelque soit le transgène inséré.

#### **Discussion**

Afin d'établir rapidement une lignée stable de souris lentigénique, il est préférable de sélectionner des fondateurs ayant un faible nombre de provirus intégrés. En effet, les transgènes sont intégrés au hasard dans le génome de la souris et sont donc répartis sur les différents chromosomes. Un fondateurs ayant intégré plusieurs copies du transgène transmettra les différentes copies de façon aléatoire à ses descendants, qui seront alors différents génétiquement.

Nous avons mis au point une méthode de QPCR qui nous permet de déterminer le nombre de copies de transgènes pour chaque animal lentigénique produit. Nous avons validé les résultats obtenus par la génétique. Certains animaux testés présentaient des nombres de copies nettement in- 45

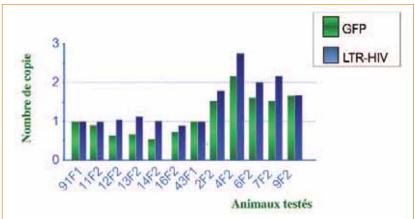


Figure 5 : Pour un même échantillon provenant de souris F1 ou F2, le nombre de copie du transgène inséré a été déterminé en utilisant soit des amorces GFP ( en vert) soit des amorces LTR (en bleu).

férieurs à 1. L'analyse du nombre de copies dans les descendants F1 de ces individus nous a permis de confirmer la nature mosaïque des fondateurs. Ce mosaïsisme a déjà été décrit (Tenenhaus et al, 2007 ; Sauvain et al, 2008) et peut s'expliquer par l'intégration tardive du virus après les premières divisions embryonnaires. La méthode que nous décrivons utilise des amorces universelles permettant de caractériser de façon fiable les animaux lentigéniques quelque soit le transgène inséré.

L'analyse du nombre de copies peut cependant s'avérer difficile. Pour exemple, on peut déduire, pour les individus ayant 0.25 copie, que l'intégration du provirus s'est réalisée tardivement au stade 4 cellules ; de même, pour les souris contenant 0.5 copie une seule intégration se serait produite au stade 2 cellules. Ce-

pendant, le nombre de copie déterminé étant un nombre moyen par cellule on ne peut pas exclure qu'un fondateur à 0.5 copie ait deux intégrations de provirus différentes qui se seraient alors produites au stade 4 cellules.

L'intérêt de la technique de transgénèse lentivirale réside aussi dans la possibilité d'obtenir à partir d'un faible nombre d'embryons injectés, de nombreux sites d'intégration différents. En effet, lors de la méiose, la ségrégation des transgènes sera identique à la ségrégation des chromosomes. En croisant une souris ayant un grand nombre de copies, avec une souris sauvage, on obtiendra des descendants qui diffèreront par leur nombre de provirus et/ou par le site d'insertion du provirus. Le site d'insertion module l'expression du transgéne. En fonction du site d'intégration l'expression

du transgène peut être éteinte. Il est donc important de sélectionner un fondateur ayant un faible nombre de provirus qui exprime le transgène. Ce qui permet d'obtenir rapidement une lignée de souris dont le phénotype n'évolue pas au cours des générations. L'utilisation de la QPCR décrite ici permet d'identifier rapidement les fondateurs remplissant ces conditions.

#### **Conclusion**

Souvent, il est intéressant d'établir plusieurs lignées génétiquement stables exprimant un transgène. Le but est de conforter les phénotypes observés en s'affranchissant d'un éventuel effet du site d'insertion du transgène. A cet effet, l'utilisation de lentivecteurs permet de générer plusieurs fondateurs transgéniques en manipulant un nombre limité d'embryons. Le nombre de copies peut être rapidement évalué grâce au protocole de QPCR que nous décrivons ici.

Mais, il est également utile de connaître la position des copies insérées. Nous envisageons maintenant de mettre au point au PBES la méthode de LAM-PCR (Linear Amplification-Mediated PCR), (Schmidt et al., 2002, Mantovani et al., 2006) qui nous permettra de suivre chaque copie de transgène inséré par l'identification du point d'insertion dans le génôme.

#### **Bibliographie**

Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg1, Ludwig B,

Stojkovic M, Boelhauve M.

Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors

EMBO Rep. 2003; 4:1054-1060.

Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert, M Sebald H, Wenigerkind H,

Brem G, Wolf E, and Pfeifer A.

Generation of Transgenic Cattle by Lentiviral Gene Transfer into Oocytes.

Biology of Reproduction 2004; 405-409

Ikawa M, Tanaka N, Kao WW, Verma IM. Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: a novel preclinical assessment of lentiviral vectors for gene therapy. Mol Ther 2003; 8:666-73.

Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D.

Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors.

Science 2002; 295: 868-72.

Mantovani J, Holic N, Martinez K, Danos O, Perea J.

A high throughput method for genomewide analysis of retroviral integration. Nucleic Acids Res. 2006; 34: 134.

McGrew M, Sherman A, Ellard F, Lillico S, Gilhooley H, Kingsman A, Mitrophanous K, Sang H.

Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors EMBO Rep. 2004 : 5: 728–733.

#### Park F.

Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis?

Physiol Genomics. 2007; 31:159-73.

#### Pfaffl. M.W.

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res., 2001; 29: 2002–2007.

#### Pfeifer A.

Lentiviral transgenesis.

Transgenic Res. 2004; 13:513-22.

Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM.

Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. Proc Natl Acad Sci USA 2002: 99:2140-5.

Schmidt M, Schwarzwaelder K, Bartholomae1 C, Zaoui K, Ball C, Pilz I, Braun S, Glimm H. von Kalle C.

High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR)

Nat Methods. 2007; 4:1051-1057.

#### Tenenhaus Dann C.

New technology for an old favorite: lentiviral transgenesis and RNAi in rats Transgenic Res. 2007: 16:571-580.

Sauvain M, Dorr A, Stevenson B, Quazzola AZ, Naef F, Wiznerowicz M, Schutz F, Jongeneel V, Duboule D, Spitz, F, Trono D. Genotypic Features of Lentivirus Transgenic Mice

Journal of virology 2008; 82: 7111-7119





Elevage conventionnel

Depuis 1974, CEDS est à l'écoute des chercheurs afin de leur proposer une production adaptée à leurs besoins :



- Chiens de race Beagle
- · Chien de race croisée Golden Retriever
- Suivi régulier des paramètres biologiques (hématologie, biochimie, évolution pondérale...)
- Contrôles sanitaires en accord avec les recommandations FELASA.

Les chiens, hébergés en semi-liberté, sont en contact avec de nombreux stimuli favorisant leur sociabilisation naturelle et leur bien-être, base de notre éthique.

L'équipe du CEDS met à votre disposition sa connaissance ainsi que son expérience pour vous conseiller et optimiser les réponses à vos besoins.



C.E.D.S.
Centre d'Elevage du Domaine des Souches

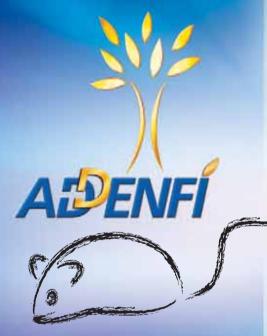
Dominine des Souches - 89130 MEZILLES Téléphone : (33) 03 86 45 40 56 - Fax : (33) 03 86 45 46 59 contact@es-souches.fr

#### Food Intake, Drinking & Actimertry

Cette plateforme modulaire est un outil puissant pour les études du comportement alimentaire et locomoteur des rongeurs. Elle permet d'obtenir de multiples paramètres précis sur la physiologie et le comportement du modèle animal :

- Dépense énergétique,
- Consommation totale des aliments,
- Taux d'ingestion,
- Taille des repas,
- Intervalles entre les repas,
- Répartition jour/nuit.

De plus, l'échantillonnage des urines-fèces, la cathéterisation et le câblage chronique du modèle expérimental.



### Phenotypage du comportement animal par Actimetrie

Cette nouvelle plateforme d'étude renseigne les chercheurs sur le comportement locomoteur des rongeurs, notamment pour la pharmacologie expérimentale.

C'est un équipement précis et ergonomique associé à un logiciel d'analyse intuitif pour exploitation des résultats :

- Mesure quantitative de l'activité totale,
- Distance parcourue,
- Vitesse du déplacement,
- Suivi du déplacement,
- Positionnement géo-local,
- Distribution de la préférence géo-locale,
- Répartition jour/nuit.

addenfi.com



ADDENFI, société de biotechnologie innovante, soutient la recherche avec des équipements modernes qui génèrent des données multiparamétriques. L'analyse combinée de ces données permet d'enrichir l'interprétation des résultats scientifiques.

Nous avons le plaisir de vous présenter nos plateformes d'étude destinées à l'exploration du métabolisme énergétique des rongeurs (FIDA) et à la compréhension du comportement du modèle animal par le biais de son activité locomotrice (PhenAct).



# Mesure de la fiabilité et de la précision des expressions faciales pour évaluer la douleur chez la souris



Crédit photo : Marion Bérard

 Maud Scotto di Perrotolo Amy L. Miller
 Matt C. Leach
 Paul A. Flecknell

Pour toute correspondance écrire à Maud Scotto di Perrotolo Email : maud.scotto@gmail.com

Comparative Biology Centre, The Medical School, Newcastle University, Framlington Place, Newcastle upon Tyne, NE2 4HH, Royaume Uni

#### **Abréviations:**

FACS: Facial Action Coding System
FAU: Unité d'Action Faciale (Facial

Action Unit)

MGS : Mouse Grimace Scale Pré-op : Pré-opératoire Post-op : Post-opératoire

#### Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier tous les volontaires qui ont participé à cette étude, l'équipe du Comparative Biology Centre pour son soutien technique et plus particulièrement Jon Gledhil pour son aide en informatique.

Sponsors : AFSTAL et Laboratory

Animals Limited

#### Résumé

Les expressions faciales, mode de communication à part entière, fascinent depuis plusieurs siècles la communauté scientifique. Utilisées comme outil de détermination de la douleur en clinique humaine, une application chez les animaux de laboratoire semble donc pertinente afin d'améliorer la prise en charge de la douleur engendrée lors de protocoles invasifs. Nos connaissances sur les expressions faciales des animaux, à l'exception des primates non humains, demeurent toutefois limitées. Cependant, Langford et al. ont récemment mis au point une nouvelle méthode d'évaluation de la douleur. appelée MGS (Mouse Grimace Scale), applicable chez la souris. Celle-ci est basée sur cinq modifications faciales spontanées, observables à la suite de protocoles douloureux. Dans l'optique d'étudier la haute précision et la fiabilité du MGS, deux études utilisant des caméras standards et des caméras Haute Définition ont été menées. Dans chacune d'elles, des participants ont été sollicités pour noter, selon cinq critères, des images de faces de souris capturées à l'état basal et une heure après une vasectomie bilatérale. La précision des réponses données par les participants sera discutée en tenant compte de plusieurs facteurs pouvant influencer la fiabilité de la méthode. Enfin. les conditions d'utilisation et les limites du MGS seront abordées.

Mots clés : expressions faciales, douleur, analgésie, vasectomie, souris

#### Measuring the accuracy and the reliability of facial expressions for assessing pain in mice Abstract

The facial expressions, way of communicating in its own right, fascinate the scientific community for several centuries. Used as an assessment tool of pain within the clinical field, an application in laboratory animals has the potential to improve pain management during invasive procedures. Our knowledge on facial expressions in non human species, except in primates, remains incomplete though. However, Langford et al. recently developed a new method to assess pain, called MGS (Mouse Grimace Scale), applicable in mice. This method is based on five spontaneous facial modifications, visible following a painful protocol. In order to study the high accuracy and the reliability of the MGS, we performed two complementary studies using Standard and High Definition cameras. In each study, participants were asked to score mouse face pictures, according five criteria, taken before and one hour after a bilateral vasectomy. The accuracy of the participants' answers will be discussed by considering several factors that can influence the reliability of the method. Finally, the conditions of use and the limits of the MGS will be presented.

Key words: facial expressions, pain, analgesia, vasectomy, mouse

#### Introduction

A travers les siècles, les travaux de nombreux scientifiques ont permis de développer nos connaissances sur les expressions faciales. Mode de communication à part entière, celles-ci font partie d'un comportement inné. C'est la conclusion qu'a émise Eibl-Eibesfeldt après avoir découvert que les mimigues faciales d'enfants atteints de cécité congénitale et d'enfants voyants étaient identiques (Eibl-Eibesfeldt, 1973). L'observation d'une parfaite similitude entre les expressions faciales de coureurs nonvovants avec celles de coureurs vovants aux Jeux Paralympiques de 2004 a permis de confirmer cette affirmation (Matsumoto et Willingham, 2009). Une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine des émotions de base chez l'Homme (peur, dégoût, colère, joie, étonnement, tristesse) a été possible grâce aux recherches de Ekman et Friesen. En développant le Facial Action Coding System (FACS), ils ont décomposé chaque émotion en Unités d'Action Faciales (Facial Action Units, FAUs), correspondant à la sollicitation d'un ou plusieurs muscles faciaux à l'état contracté ou relâché (Ekman et Friesen, 1978). Véritable outil d'évaluation de la douleur, les expressions faciales sont aujourd'hui très utilisées dans le domaine clinique chez les nouveaunés ou les sujets incapables de communiquer verbalement. Darwin a été l'un des premiers à s'intéresser aux expressions faciales et à soutenir la thèse que les animaux sont capables de ressentir et d'exprimer des émotions telles que la douleur (Darwin, 1872). Ses études menées en parallèle sur l'animal et sur l'Homme l'ont amené à penser que les expressions

faciales font partie d'un caractère transmis à travers l'évolution.

L'évaluation et la prise en charge de la douleur des animaux de laboratoire lors d'un protocole invasif apparaît comme une nécessité afin de promouvoir le respect du bien-être animal et d'assurer la fiabilité scienti-Parmi les méthodes figue. développées pour évaluer la douleur, le comportement spontané a été largement analysé chez le rat (Roughan et Flecknell, 2001) et la souris (Wright-Williams et al., 2007). Des systèmes automatisés (HomeCageScan) ont également été utilisés avec succès pour détecter des modifications comportementales à la suite d'une procédure invasive (Dickinson et al., 2009). En plus des techniques d'analyse du comportement spontané, des tests nociceptifs mécaniques, chimiques, électriques et thermiques ont été développés pour évaluer la douleur chez les animaux de laboratoire (Flecknell, 1984; Le Bars et al., 2001). Cependant, la combinaison de plusieurs méthodes est souvent nécessaire pour pouvoir quantifier précisément la douleur perçue et déterminer le degré d'analgésie à apporter. Ainsi, le récent développement de l'évaluation des expressions faciales pourrait constituer un outil supplémentaire intéressant, tel qu'il est employé chez l'Homme, pour évaluer la douleur chez les animaux de laboratoire.

La majorité des travaux sur les expressions faciales des animaux ont été menés chez le primate, de par sa proximité phylogénétique et comportementale avec l'Homme (Preuschoft, 2000 ; Parr et Waller, 2006). Ainsi, bien que les rongeurs représentent la part la plus importante d'animaux de laboratoire utilisés en recherche biomédicale, leurs expressions faciales ont été très peu étudiées. L'équipe de Langford a mis au point une nouvelle méthode d'évaluation de la douleur basée sur les expressions faciales chez la souris présentée comme faisant preuve d'une "haute précision" et d'une "fiabilité certaine" (Langford *et al.* 2010). Cette méthode, appelée MGS (Mouse Grimace Scale), s'appuie sur des modifications spontanées des expressions faciales chez la souris, induites par des procédures douloureuses.

Cinq critères morphologiques faciaux, ou unités d'action faciales (FAUs) sont définis comme suit et des illustrations ont été données en exemple pour chacune d'eux (Figure 1):

- > Resserrement orbitaire (orbital tightening) : rétrécissement de l'aire orbitaire par fermeture de la paupière et pli visible autour de l'œil ;
- > **Gonflement du museau** (nose bulge) : bombement cutané visible sur l'arête de celui-ci ;
- > Gonflement des joues (cheek bulge) : apparence convexe des muscles malaires (entre les yeux et la racine des vibrisses) par rapport à leur état basal ;
- > **Position des oreilles** (ear position): oreilles écartées et situées en arrière
- > Modification de la conformation des vibrisses (whisker change) : mouvement des vibrisses vers l'arrière (accolées à la face) ou vers l'avant, comme étant tirées par leur extrémité. Les vibrisses peuvent également apparaître regroupées par rapport à leur position de base.

Dans l'optique d'étudier la haute précision et la fiabilité du Mouse Grimace Scale développé par Langford *et al.*, deux études utilisant des caméras Standards et des caméras Haute Définition ont été menées. Ainsi, des images issues de séguences vidéo enregistrées lors de ces deux études ont été analysées afin d'évaluer la douleur associée à une vasectomie bilatérale chez la souris. Celle-ci a été réalisée selon l'approche abdominale pour l'étude Standard et selon l'approche scrotale pour l'étude Haute Résolution.

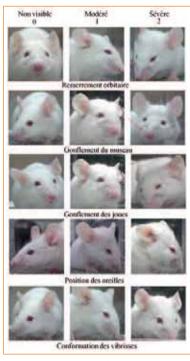


Figure 1 Images données en exemple par Langford et al. pour scorer l'intensité de chaque unité d'action faciale (FAU) : resserrement orbitaire, gonflement du museau, gonflement des joues, position des oreilles, conformation des vibrisses. Les images sont rangées par intensité croissante pour chaque paramètre étudié selon une échelle à 3 points. 0 : non visible, 1 : modéré, 2 : sévère

#### Matériel et méthodes

#### 1) Animaux

#### a) Etude Standard

Dans cette étude, l'analyse de vidéos de souris préalablement enregistrées dans le cadre d'une autre étude (Dickinson et al., 2009) a permis d'éviter le recours à des animaux. Ces vidéos correspondaient à six souris CBA/Ca-Crl et six souris DBA/2JCrl mâles subissant une vasectomie abdominale. filmées la veille et le jour de la chirurgie. 30 minutes avant le début de la chirurgie, trois souris de chaque souche ont été traitées oralement avec une solution saline ou du paracétamol introduit dans l'eau de boisson à raison de 246 mg/kg. Pour plus de détails sur le protocole, voir Dickinson et al., 2009.

#### b) Etude Haute Résolution

#### \* Traitements

Les animaux utilisés dans cette étude faisaient partie d'un programme de production de souris transgéniques nécessitant l'utilisation de souris vasectomisées. L'ensemble des procédures était en accord avec Animals (Scientific Procedures) Act 1986 (Loi sur les animaux - Procédures scientifigues) et a été approuvé par le comité d'éthique local.

18 souris CD1 mâles (Charles River Laboratories Inc, Margate, Kent, UK) pesant entre 29 et 39,4 q ont été hébergées individuellement dans des cages ventilées en plastique (North Kent Ltd, Kent, UK) à leur arrivée durant une période d'acclimatation de 7 iours. La température dans l'animalerie était maintenue à 23  $\pm$  1°C, avec 35 % d'humidité et un cycle jour/nuit 12/12h (éclairage à 7 heures). La nourriture (CRM (P), SDS Ltd, Essex, UK) et l'eau étaient disponibles ad libitum. La litière était composée de sciure de bois (DBM, Broxburn, UK) et de papier découpé (DBM, Broxburn, UK) pour permettre un environnement enrichi. Chaque animal a été attribué au hasard dans un groupe de traitement le jour précédant la chirurgie. Six souris de chaque groupe ont subi

différents traitements 30 minutes avant le début de la chirurgie ou durant la chirurgie (Tableau I). Celles-ci ont recu une injection sous-cutanée d'une solution saline ou de meloxicam (20 mg/kg) (Metacam, Boehringer Ingelheim, Labiana Life Sciences S.A. Terrassa, Spain). Un autre groupe a reçu une application de bupivacaïne hydrochloride sur la plaie (5 mg/kg) (Marcain 0,5%, AstraZeneca UK Ltd) durant la chirurgie, qui est un anesthésique local possédant des propriétés analgésiques (Flecknell et Waterman-Pearson, 2000).

Groupe	Nombre de souris	Traitement		
А	6	Saline		
В	6	Meloxicam (20 mg/kg)		
C 6		Bupivacaine (5 mg/kg)		

Tableau I : Groupes de traitements analgésiques pour les souris de l'Etude Haute Résolution

#### \* Chirurgie

La vasectomie a été effectuée selon l'approche scrotale. L'anesthésie a été induite par un mélange d'isoflurane et d'oxygène (induction 5 % 2 L/min) dans une chambre à induction pendant environ deux minutes. Les souris ont ensuite été placées sur une couverture chauffante pour maintenir la température corporelle constante et l'entretien de l'anesthésie a été réalisé via un masque libérant de l'isoflurane (2,5 % 0,5 L/min). La peau a été vaporisée avec de la chlorhexidine (Hydrex Derma spray, Adams Healthcare, Leeds, UK) puis une incision verticale de 0.5cm a été faite dans la zone médiane du sac scrotal. Après identification des canaux déférents, une cautérisation a permis leur obstruction. La peau a ensuite été refermée à l'aide 51

de tissu-colle (Nexaband, Abbott laboratories, Chicago).

Le meloxicam a été choisi en raison de sa capacité à soulager la douleur après une vasectomie chez la souris (Wright Williams *et al.*, 2007). Bien que la bupivacaïne n'ait pas été testée sur des souris vasectomisées, cet anesthésique local a été choisi en raison de l'efficacité analgésique qu'il procure chez l'homme après une telle procédure (Paxton *et al.*, 1995).

### 2) Acquisition des images a) Etude Standard

Chaque souris a été filmée durant 40 minutes, la veille de la chirurgie, à l'aide d'une caméra standard (Sony DCR-HC96) positionnée à une distance fixe de la cage. Les souris ont ensuite été filmées une heure postvasectomie pour étudier leur comportement post-opératoire. A la fin de chaque acquisition vidéo, les souris ont reçu une injection sous-cutanée de Carprofen (Rimadyl 50 mg/mL, Pfizer plc, Allemagne) à raison de 5 mg/kg et ont été remises dans leur cage d'hébergement (pour plus de détails voir Dickinson *et al.*, 2009).

#### b) Etude Haute Résolution

La veille de la chirurgie, les souris ont été placées individuellement dans une cage en Plexiglas (44 cm x 28 cm x 13 cm) possédant une paroi opaque. Chaque souris a été filmée séparément à l'aide de deux caméras Haute Définition (Sony High Definition HandyCam modèle HDR-XR155) durant 12 minutes. Les caméras ont été positionnées comme présenté sur la Figure 2, afin d'avoir la probabilité la plus élevée de visualiser les expressions faciales des souris. Une fois l'acquisition des images terminée,

chaque souris a reçu une injection sous-cutanée de buprénorphine (0,05 mg/kg) sous la forme Vetergesic (Alstoe Animal Health) et a été remise dans sa cage d'hébergement.

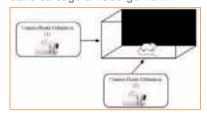


Figure 2 : Disposition des caméras Haute Définition

### 3) Analyse vidéo et notation des images

#### a) Etude Standard

20 vidéos enregistrées en pré-op et 20 en post-op ont été analysées après numérisation avec le logiciel Final Cut Pro 7. Les vidéos ont été visualisées avec AVS Video Remaker (version 3.1.1.83) et des captures d'écran ont été réalisées dès que la face de souris était clairement visible. Les images ainsi obtenues ont été sélectionnées pour ne garder que 100 images dans chaque condition opératoire (pré-op et post-op) et ont été rognées pour ne garder que l'aire faciale. Cette étape est importante pour éviter d'autres facteurs, comme un pelage souillé, pouvant influencer les participants lors de la notation. En condition postopératoire, parmi les 100 images sélectionnées, 50 correspondaient aux souris traitées avec la solution saline, 50 autres aux souris traitées au para-

Notation de
l'intensité des FAUs
Non visible 0
Modérée 1
Sévère 2

cétamol. Des précautions ont été prises lors du choix des images. Aucune capture d'écran n'a été réalisée lorsque la souris présentait les comportements d'exploration, de toilettage ou de repos. En effet, ceux-ci provoquent une modification de l'expression faciale de base et peuvent induire une grimace comparable à celle que l'on peut observer lorsqu'une souris perçoit de la douleur (Langford *et al.*, 2010).

Les images ont ensuite été randomisées puis chacune d'entre elles a été notée sur les différentes FAUs (resserrement orbitaire, gonflement des joues, position des oreilles, gonflement du museau, conformation des vibrisses) et sur la douleur globale perçue. Ce score de douleur globale correspond à une impression générale faite par les participants sur la douleur que la souris est susceptible de res-

21 participants, plus ou moins expérimentés, ont contribué à la notation des images en se basant sur un document explicatif. Parmi eux, 1 vétérinaire, 6 scientifiques, 7 techniciens, 4 étudiants en sciences et 3 personnes "inexpérimentées" (c'est-àdire n'ayant aucune connaissance sur le comportement des souris au préalable) devaient attribuer la note de "0" si l'unité d'action faciale semblait peu visible, "1" si elle était modérément visible ou "2" si elle était sévèrement visible (Tableau IIa). Pour la douleur globale perçue, les participants de-

Notation de la douleur globale	Echelle				
Non visible	0				
Légère / Modérée	1				
Sévère	2				
(1	h)				

Tableau II : Légende de notation de l'intensité des unités d'action (FAUs) (a) et de la douleur globale (b)

vaient choisir entre "0" s'ils pensaient que la souris n'était pas en souffrance, "1" si elle l'était légèrement ou modérément, "2" si elle l'était sévèrement (Tableau Ilb). Dans chaque cas, si l'image était jugée trop floue ou si le participant ne parvenait pas à noter un paramètre, la réponse "Ne sait pas" était attribuée.

#### b) Etude Haute Résolution

Les vidéos de souris filmées en pré-op et post-op ont été analysées à l'aide du logiciel Quicktime (version 7.6.6). En utilisant la même méthodologie que dans l'Etude Standard, des captures d'écran ont été réalisées à partir de chaque séquence. Une sélection a permis de garder les images les plus nettes possibles soit 60 images dans chaque condition chirurgicale (30 images en pré-op et 30 en postop). Parmi les 30 images en condition post chirurgicale, 10 images ont été sélectionnées pour chaque traitement (saline, meloxicam et bupivacaïne). 21 participants ont contribué à la notation des images dont 4 techniciens, 7 étudiants en sciences, 5 chercheurs. 3 vétérinaires et 2 personnes "inexpérimentées" (Tableau II).

Si l'image était jugée comme étant trop floue, le participant devait attribuer la réponse "Ne sait pas" pour l'unité d'action concernée ou la douleur.

### 4) Traitement des données *a) Etude Standard*

Pour pouvoir évaluer la précision des réponses données par les participants, les moyennes des scores attribués pour chaque FAU et par l'ensemble des participants ont été calculées dans chaque condition opératoire (pré-op et post-op). En théorie, les images issues des séquences filmées en pré-op ont

été évaluées comme correspondant à une situation sans douleur, soit à un score théorique de "0" pour chaque FAU et la douleur globale percue. Comme suggéré par une précédente étude menée chez la souris, la vasectomie bilatérale provoque une douleur intense associée à des comportements douloureux spécifiques (Wright-Williams et al., 2007). Ainsi, les images de souris prises à partir de séquences post-op issues du groupe saline ont été supposées comme correspondant à un état de douleur "sévère", soit à une note théorique de "2" pour l'ensemble des critères étudiés. Enfin. les images post-op issues du groupe traité au paracétamol ont été considérées comme correspondant à une douleur "faible à modérée", soit à une note théorique de "1". Une analyse comportementale réalisée précédemment a suggéré l'inefficacité du paracétamol pour soulager la douleur induite par une vasectomie chez la souris (Dickinson et al., 2009). Cependant, il est raisonnable de considérer qu'à forte dose, le paracétamol permet une analgésie. Les différences entre les notes moyennes pratiques (attribuées par les participants) et les notes moyennes théoriques ont été calculées.

La précision des réponses données par les participants est exprimée en pourcentage de faux positifs (lorsque le score attribué est supérieur au score théorique), de réponses correctes (lorsque le score attribué correspondait au score théorique), d'échec (lorsque le score attribué est inférieur au score théorique) et de réponses "Ne sait pas" (Tableau III).

#### b) Etude Haute Résolution

Les données ont été traitées en utilisant la même méthodologie que celle utilisée pour l'Etude Standard pour pouvoir évaluer la précision des réponses. Les souris du groupe saline ont été considérées comme percevant une douleur sévère. Les images correspondantes à ce groupe correspondaient donc à un score théorique de "2". Les images de souris issues du groupe meloxicam ont été supposées comme correspondant à une douleur faible à modérée et donc associées à un score théorique de "1". En effet, l'analyse comportementale de souris vasectomisées traitées avec du meloxicam à raison de 20 mg/kg a montré qu'une analgésie efficace avait été induite (Wright-Williams et al., 2007). De plus, comme l'efficacité de la bupivacaïne à soulager la douleur induite par une vasectomie chez l'homme a pu être mise en évidence (Paxton et al., 1995), les images issues de ce groupe de traitement ont également été supposées comme associées à une douleur faible à modérée. En procédant de la même manière que dans l'Etude Standard, les notes attribuées pour l'unité d'action faciale "vibrisses" n'ont pas été prises en compte étant donné que la majorité des participants ne sont pas parvenus à visualiser ce critère.

Précision des réponses	Différence (score attribué - score théorique)
Faux positif	Score attribué supérieur au score théorique
Correct	Score attribué équivalent au score théorique
Echec	Score attribué inférieur au score théorique
«Ne sait pas»	/

Tableau III : Evaluation de la précision des réponses données

### c) Vue globale sur la précision des réponses

Les différences moyennes entre les scores pratiques et théoriques pour l'ensemble des paramètres (sauf les vibrisses) ont été calculées dans chaque étude. Les résultats sont présentés en pourcentages moyens de faux positifs, réponses correctes, d'échec et réponses "Ne sait pas" pour l'ensemble des FAUs (sauf les vibrisses) et dans chaque condition opératoire (pré-op et post-op). De plus, pour chaque FAU, le pourcentage moyen de réponses correctes a été calculé afin de d'évaluer la facilité de notation des différents critères.

### d) Influence de l'expérience des participants

Les pourcentages de réponses correctes pour chaque FAU ont été calculés dans chaque étude en fonction de la connaissance des participants sur le comportement de douleur des animaux de laboratoire (personnes "expérimentées" (scientifiques, étudiants en sciences, vétérinaires, techniciens) et personnes "non-expérimentées")). Pour chaque catégorie, les pourcentages moyens de réponses correctes ont été calculés afin de déterminer si l'expérience des participants exerçait une influence sur la notation des images.

#### Résultats

#### 1) Etude Standard

Comme présenté sur la Figure 3, la plupart des participants sont parvenus à noter correctement les images issues de la session pré-op pour le resserrement orbitaire (72,9 % de réponses correctes). Les pourcentages de réponses correctes en pré-op pour la position des oreilles (56,9 %), le

gonflement du museau (42 %) et le gonflement des joues (53,7 %) ne sont pas aussi élevés. En condition post-opératoire, ces pourcentages sont faibles, notamment pour le resserrement orbitaire (38,2 %), la position des oreilles (34,1 %), le gonflement du museau (35,8 %) et le gonflement des joues (27,6 %). A l'inverse, ces mêmes unités d'action ont obtenu des pourcentages d'échec élevés (resserrement orbitaire: 41,8 %; position des oreilles : 51,4 %; gonflement du museau : 47,4 % ; gonflement des joues : 59 %). La plupart des participants n'ont pas été capables de noter l'unité "vibrisses" aussi bien en condition pré-opératoire (55,8 % de réponses "Ne sait pas") que post-opératoire (46 % de réponses "Ne sait pas").

Enfin, pour l'évaluation de la douleur globale perçue, les proportions de réponses correctes (52,6 %) et de faux-positifs (47,4 %) sont très proches en condition pré-opératoire. En post-op, les notes attribuées pour la douleur globale ont donné lieu à 41,3 % de faux positifs et seulement 29 % de réponses correctes.

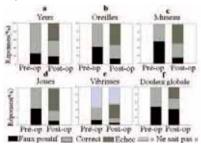


Figure 3: Précision des réponses données dans l'Etude Standard pour chaque critère: resserrement orbitaire (a), position des oreilles (b), gonflement du museau (c), gonflement des joues (d), conformation des vibrisses (e) et évaluation de la douleur globale (f). Les résultats sont présentés en pourcentage de faux positifs, réponses correctes, d'échec et de réponses "Ne sait pas" pour chaque condition opératoire.

#### 2) Etude Haute Résolution

Les réponses données pour les images de la session pré-op (Figure 4) sont majoritairement correctes pour le resserrement orbitaire (94,4 %), la position des oreilles (58,9 %), le gonflement des joues (68,4 %) et pour la douleur globale (61,3 %). Les réponses données en pré-op pour le gonflement du museau et pour la conformation des vibrisses sont moins précises avec 52,4 % de réponses correctes dans chaque cas.

L'unité "vibrisses" a obtenu le plus de réponses "Ne sait pas" en pré-op (25,6 %) et demeure élevé en post-op (35,4 %) par rapport aux autres FAUs. En session post-op, les pourcentages d'échec pour le resserrement orbitaire (78 %), la position des oreilles (55,1 %), le gonflement du museau (60,6 %), gonflement des joues (58,9 %) et la douleur globale (48,3 %) sont élevés.

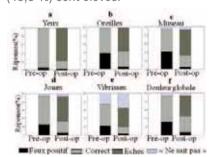


Figure 4: Précision des réponses données dans l'Etude Haute Résolution pour chaque critère étudié: resserrement orbitaire (a), position des oreilles (b), gonflement du museau (c), gonflement des joues (d), conformation des vibrisses (e) et évaluation de la douleur globale (f). Les résultats sont présentés en pourcentage de faux positifs, réponses correctes, d'échec et de réponses "Ne sait pas" pour chaque condition opératoire.

### 3) Vue globale sur la précision des réponses

Les résultats des fréquences cumulées des réponses données pour l'ensemble des FAUs (à l'exception des vibrisses) présentés sur la Figure 5 indiquent que la majorité des participants sont parvenus à noter les images en pré-op correctement dans chaque étude (pourcentage de réponses correctes : 56,4 % pour l'Etude Standard ; 68,5 % pour l'Etude Haute Résolution). Le pourcentage de faux positifs demeure toutefois conséquent en pré-op en particulier dans l'Etude Standard (41,9 %) par rapport à celui obtenu dans l'Etude Haute Résolution (28,2 %).

Les résultats des fréquences cumulées des réponses données pour l'ensemble des FAUs (sauf les vibrisses) en post-op révèlent que le pourcentage de bonnes réponses est plus faible qu'en condition pré-op, et ce, pour chacune des études réalisées (Etude Standard: 33,9 %; Etude Haute Résolution : 28,1 %). La plupart des participants ont échoué lors de la notation des images prises en post-op à 49,9 % dans l'Etude Standard et 63,2 % dans l'Etude Haute Résolution.

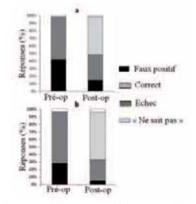


Figure 5 : Précision des réponses de l'Etude Standard (a) et de l'Etude Haute Résolution (b) pour l'ensemble des FAUs (sauf les vibrisses). Les résultats sont présentés en pourcentage de faux positifs, de réponses correctes, d'échec et de réponses "Ne sait pas" pour chaque condition opératoire.

### 4) Influence de l'expérience des participants

Les résultats présentés dans le Tableau IV indiquent que le pourcentage moyen de réponses correctes pour l'ensemble des FAUs est inférieur à 50% quelle que soit la catégorie des participants. Cependant, dans chaque étude, le pourcentage moyen de bonnes réponses des participants expérimentés (Etude Standard : 45,2 %; Etude Haute Résolution : 46,5 %) est supérieur à celui obtenu pour les personnes inexpérimentées (Etude Standard : 34,1 %; Etude Haute Résolution : 37,7 %).

De plus, l'analyse des scores attribués pour chaque FAU indique que l'unité "vibrisses" semble la plus difficile à évaluer avec dans chaque étude des pourcentages de réponses correctes les plus faibles par rapport aux autres unités d'action, et ce, quelle que soit l'expérience des participants (Etude Standard : 33,5 %; Etude Haute Résolution: 28,8 %). Ce critère d'étude a également rassemblé le plus de réponses "Ne sait pas" pour l'ensemble des participants alors que très peu de réponses de ce type n'ont été émises pour les autres unités d'action (données non présentées).

a							
Catégorie	Pourcentage de réponses correctes					Pourcentage moyen de réponses correctes en	
valegorie	Yeux	Museau	Joues	Oreilles	Vibrisses	fonction de la catégori des participants	
Participants expérimentés	56,7	41,2	43,2	48,2	36,6	45,2	
Participants inexpérimentés	46	30,2	27,8	36,3	30,3	34,1	
Pourcentage moyen de réponses correctes pour chaque FAU	51,4 #1	35,7 #3	35,5 #4	42,3 #2	33,5 #5		

b						
Catégorie	Pourcentage de réponses correctes					Pourcentage moyen de réponses correctes en
oategorie	Yeux	Museau	Joues	Oreilles	Vibrisses	fonction de la catégori des participants
Participants expérimentés	56,1	42,3	49,4	49,1	35,5	46,5
Participants inexpérimentés	58,3	30,6	33,3	44,4	22	37,7
Pourcentage moyen de réponses correctes pour chaque FAU	57,2 #1	36,5 #4	41,4 #3	46,8 #2	28,8 #5	

Tableau IV: Pourcentage de réponses correctes en fonction de l'expérience des participants pour l'Etude Standard (a) et l'Etude Haute Résolution (b). Ces deux tableaux présentent les pourcentages de réponses correctes pour chaque FAU et les pourcentages moyens de réponses correctes. # indique le classement des FAUs en fonction des bonnes réponses obtenues.

L'unité "resserrement orbitaire" a rassemblé le plus de réponses correctes dans les deux études (Etude Standard: 51.4 %: Etude Haute Résolution: 57,2 %). La classification des pourcentages de réponses correctes montre que l'unité "position des oreilles" se situe en seconde position (Etude Standard: 42,3 %; Etude Haute Résolution : 46,8% de réponses correctes). Enfin, les unités "gonflement des joues" (Etude Standard : 35,5 %; Etude Haute Résolution: 41,4 % de réponses correctes) et "gonflement du museau" (Etude Standard: 35,7 %; Etude Haute Résolution : 36.5 % de réponses correctes) ont rassemblé moins de réponses correctes que les deux unités d'action précédentes.

#### **Discussion**

Bien que l'expérimentation animale demeure une nécessité en recherche biomédicale, son recours est aujourd'hui soumis à des règles éthiques strictes. La douleur constitue un des facteurs majeurs à prendre en compte à tout moment lors d'une procédure invasive. Une prévention et une prise en charge rapide par l'utilisation d'analgésiques sont essentielles. Mais avant même d'envisager l'atténuation de la douleur chez un animal, il faut pouvoir l'évaluer. Diverses techniques, généralement utilisées de manière complémentaire, permettent aujourd'hui l'évaluation de la douleur chez la souris. Le nouveau "système d'évaluation comportementale standardisé ", nommé MGS par ses créateurs, permettrait une meilleure prise en charge de la douleur engendrée lors d'un protocole invasif chez la souris.

En condition post-opératoire, les résultats indiquent que la plupart des

participants n'auraient pas administré de traitement analgésique à des souris qui étaient pourtant en détresse. Dans ce cas. la notation de l'ensemble des FAUs était incorrecte, avec une majorité d'échec. Les scores attribués par les participants étant inférieurs aux scores théoriques, la douleur des souris vasectomisées a donc été sousestimée. En effet, des analyses comportementales conventionnelles de souris vasectomisées suggèrent que cette procédure est douloureuse (Dickinson et al., 2009; Wright-Williams et al., 2007). Bien que dans l'Etude Standard l'évaluation de la douleur globale en post-op avait tendance à être surestimée avec un taux important de faux positifs, il s'agit d'une situation unique. Cette sur-évaluation suggère que les participants auraient administré un traitement analgésique à des souris qui n'éprouvaient aucune douleur. A l'inverse, dans l'Etude Haute Résolution, la douleur globale a été mal évaluée en post-op, révélée par l'attribution de très nombreuses réponses incorrectes.

Malgré l'utilisation de caméras Haute Définition, la précision des réponses données pour les images capturées en post-op n'a pas été améliorée par rapport à l'Etude Standard. Ceci est d'autant plus vrai pour l'unité vibrisse qui nécessite une extrême précision que nous ne sommes pas parvenus à atteindre malgré l'utilisation de matériel sophistiqué. Ainsi, la notation de ce critère apparaît comme étant très subtil, avec des pourcentages de réponses correctes les plus faibles par rapport aux autres FAUs. Ainsi, la plupart des participants étaient incapables d'observer une modification des vibrisses et ont préféré ne pas attribuer de note. L'amélioration de la

précision des images obtenues apparaît comme un point primordial à considérer avant d'envisager la réalisation d'autres études.

Malgré ce manque de précision, l'unité "resserrement orbitaire" a obtenu le pourcentage de réponses correctes le plus élevé dans les deux études et semble être le critère le plus visible, devant les unités "position des oreilles", "gonflement du museau" et "gonflement des joues". Ce critère semble être le plus objectif et le plus facile à utiliser pour mesurer la douleur chez la souris lors de l'observation des expressions faciales.

Par ailleurs, l'expérience des participants semble influencer la notation des images. En effet, les participants ayant des connaissances sur le comportement des rongeurs au préalable, de par leur activité professionnelle, sont meilleurs observateurs que ceux "inexpérimentés", c'est-à dire n'ayant a priori aucune connaissance sur le comportement de ces animaux. Bien que les personnes spécialistes soient parvenues à évaluer les différents critères d'étude plus aisément que les non-spécialistes, une formation de l'ensemble des participants à la méthode MGS semble primordiale avant le début de l'observation des images. En effet, le MGS nécessite une expertise qui ne peut s'acquérir qu'après avoir été sensibilisé à l'observation des cinq critères morphologiques faciaux.

Comme toute méthode appliquée chez l'animal, le MGS est probablement soumis aux variations intra-individuelles et inter-souches. De précédentes analyses comportementales chez la souris subissant une vasectomie abdominale ont permis de mettre en évidence l'existence de différences

comportementales entre des souris de souche CBA et DBA/2 (Dickinson et al., 2009). De plus, le fond génétique peut influer sur la perception de la douleur et cette dernière peut varier selon les souches ou le sexe des souris étudiées (Mogil et al., 1997). A travers ces deux études, nous avons pu observer que la couleur du pelage des souris semblait influencer la visibilité des FAUs. En effet, chez les souris au pelage blanc ou gris (souris CD1 et DBA/2), l'observation des critères morphologiques faciaux était plus facile que chez les souris au pelage marron (CBA). Comme suggéré par Langford et al., l'utilisation d'un paroi opaque au fond de la cage utilisée pour l'acquisition vidéo doit créer un contraste et limiter les reflets. Il semblerait que l'utilisation de cette paroi opaque a permis une amélioration de la visibilité des expressions faciales des souris CD1 par rapport à l'Etude Standard.

Le choix du nombre d'images à analyser représente une autre limite à cette méthode puisque la représentativité des résultats en dépend. Cependant, il faut considérer le fait qu'un trop grand nombre d'images a tendance à décourager les participants, comme cela a été le cas pour l'Etude

Standard (200 images). Par ailleurs, selon le nombre d'images sélectionnées, leur analyse nécessite un laps de temps qui n'est pas tolérable si un animal est en souffrance. Il est donc préférable de considérer la méthode MGS comme un outil complémentaire d'évaluation de la douleur, parallèlement aux techniques d'analyse du comportement spontané et aux tests nociceptifs traditionnels. Le MGS pourrait aussi être introduit lors de formations afin de fournir des informations pertinentes relatives au comportement de douleur chez la souris. Enfin, des tests gustatifs ont permis de mettre en évidence la présence du réflexe gusto-facial chez le rat (Grill et Norgren, 1978). Ceci suggère que le rat est capable de solliciter ses muscles faciaux pour s'exprimer, dans ce cas vis-à-vis de son aversion ou de sa préférence envers les stimuli gustatifs testés. Les expressions faciales de la douleur chez le rat n'ont pas encore été étudiées. Cependant, l'existence d'un tel réflexe laisse penser que le rat peut également exprimer sa détresse par l'intermédiaire des expressions faciales. De plus, à l'exception des primates non-humains, nos connaissances sur les expressions faciales des émotions chez

d'autres animaux de laboratoire demeurent limitées. Des investigations dans ce sens pourraient contribuer à l'amélioration continue de la prise en charge de la douleur des animaux utilisés en recherche biomédicale.

#### Conclusion

Pour conclure, la méthode Mouse Grimace Scale développée par Langford et al. apparaît comme un outil intéressant pour évaluer la douleur chez la souris. Son utilisation nécessite toutefois la prise en compte de multiples facteurs comme une formation préalable des participants et une perception de la douleur variable selon les individus et les souches de souris étudiées. D'autre part, une utilisation directe du Mouse Grimace Scale semble difficile. Les déplacements de la souris étant très rapides pour l'œil humain, ils ne permettent pas une observation précise des critères à travers la cage. Ainsi, l'analyse des images issues des séquences vidéo nécessite également un délai inconcevable si l'animal est en détresse. Il est donc raisonnable de considérer le MGS comme une méthode complémentaire aux techniques pré-existantes, afin d'affiner l'évaluation de la douleur.

#### Références

- Darwin C (1872) The Expression of the Emotions in Man and Animals (*John Murray Ed*) London
- Dickinson AL, Leach MC et Flecknell PA (2009) The analgesic effects of oral paracetamol in two strains of mice undergoing vasectomy. *Lab. Anim.* 43, 357-361
- Eibl-Eibesfeldt I (1973) The expressive behavior of the deaf-and-blind born. In : Social communication and movement (von Cranach M et Vine I, Eds), New York, Academic Press, 163-194
- Ekman P et Friesen W (1978) Facial action coding system: A technique for the measurement of facial movement. (*Consulting Psychologists Press Ed*) Palo Alto. CA
- Flecknell PA (1984) The relief of pain in laboratory animals. *Lab. Anim.* 25, 147-160
- Flecknell PA et Waterman-Pearson A (2000). Pain management in animals. (*WB Saunders* Ed) London

- Grill HJ et Norgren R (1978) The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res.* 143, 263–279
- Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, LaCroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AMJM, Ferrari MD, Craig KD et Mogil JS (2010) Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat. Methods* 7, 447-449
- Le Bars D, Gozariu M et Cadden SW (2001) Animal models of nociception. *Pharmacol.* Rev. 53, 597-652
- Matsumoto D et Willingham B (2009) Spontaneous facial expressions of emotion of congenitally and noncongenitally blind individuals. *J. Pers. Soc. Psychol.* 96, 1-10
- Mogil JS, Richards SP, O'Toole LA, Helms ML et Mitchell SR, Belknap JK (1997) Genetic sensitivity to hot-plate nociception in DBA/2J and C57BL/6J inbred mouse

- strains: possible sex-specific mediation by gamma2-opioid receptors. *Pain* 70, 267-277
- Parr L et Waller BM (2006) Understanding chimpanzee facial expression: insights into the evolution of communication. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 1, 221-228
- Paxton LD, Huss BK, Loughlin V et Mirakhur RK (1995) Intra-vas deferens bupivacaine for prevention of acute pain and chronic discomfort after vasectomy. *Br. J. Anaesth.* 74, 612-613
- Preuschoft S (2000) Primate faces and facial expressions. *Soc. Res.* 67, 245-271
- Roughan JV et Flecknell PA (2001) Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. *Pain* 90, 65-74
- Wright-Williams SL, Courade JP, Richardson CA, Roughan JV et Flecknell PA (2007) Effects of vasectomy surgery and meloxicam treatment on faecal corticosterone levels and behaviour in two strains of laboratory mouse. *Pain* 130, 108-118



P.O. Box 2170 5001 CD Tilburg The Netherlands

## burg Fax: + 31 13 4550175 ands E-mail: info@hartelust.net Macaca fascicularis

Tel: + 31 13 4555189

Macaca mulatta
Primate serum – plasma available

Purpose bred for research use
Health screened for a range of organisms
Quarantined before shipment
Full documentation with every delivery
Direct delivery in own vehicle
Prices and terms on request

## Du nématode *Caenorhabditis elegans* et de son utilisation en laboratoire



C. Couillault <sup>1, 2, 3</sup>
 C. Léopold Kurz <sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Université de la Méditerranée, Case 906, 13288 Marseille cedex 9, France <sup>2</sup>INSERM, U631, 13288 Marseille, France <sup>3</sup>CNRS, UMR6102, 13288 Marseille, France

\*Correspondance: kurz@ciml.univ-mrs.fr

#### Résumé

Le nématode Caenorhabditis elegans (C. elegans) est un invertébré combinant simplicité et complexité. Cette dualité permet de l'utiliser comme modèle pour étudier rapidement et relativement aisément d'importants processus biologiques relevant pour tous les eucarvotes. Dans cette revue seront présentés les aspects majeurs de l'anatomie et de la physiologie de ce nématode ainsi que certains des principaux outils utilisés en laboratoire. Des expériences marquantes tant du point de vue méthodologique qu'historique seront décrites pour illustrer les possibilités de l'animal. Finalement, l'étude de l'immunité antifongique de ce ver sera utilisée comme exemple pratique pour présenter les ressources de C. elegans et mettre en contexte les outils décrits.

#### Introduction

#### De l'humus à la gélose

Les premières publications qui parlent de C. elegans datent de la fin du 19ème siècle et sont le fruit du travail du biologiste français Emile Maupas (http://wormbase.sanger.ac.uk/papers/ 1900-maupas/Maupas 1900.pdf). Cet archiviste de formation passionné de sciences naturelles, consacre son temps libre à l'étude d'animaux microscopiques présents dans le sol. L'académie des sciences remarque la qualité de ses travaux et le nomme en 1901 correspondant pour l'institut en Algérie. Ce naturaliste est particulièrement intrigué par le mode de reproduction hermaphrodite de certains vers et il est le premier à décrire précisément l'anatomie de C. elegans qu'il isole d'un humus en Algérie. C'est ainsi que ce vers fut sorti de terre!

A partir des années 1940, des travaux de différents biologistes sur les nématodes dont *C. elegans* vont permettre de mieux connaitre ce petit invertébré. On peut relever les travaux d'Ellsworth Dougherty (Dougherty and Calhoun, 1948) et de Victor Nigon (Nigon and Dougherty, 1949) qui décrieront respectivement le mode de nutrition et la croissance des nématodes *Caenorhabditides* ainsi que le mode de reproduction de *C. elegans*.

C'est à partir de 1960 que la carrière de cet animal en tant que modèle en biologie va prendre son essor. En effet, le biologiste moléculaire Sydney Brenner à qui nous devons déjà des avancées remarquables sur la nature du code génétique (Crick et al., 1961) obtient de E. Dougherty des spécimens de *C. ele-*

#### Remerciements

À Jonathan Ewbank et Olivier Zugasti pour les commentaires et discussions.

gans (la souche N2) isolée quelques années plus tôt à Bristol en Angleterre. Il en fait son modèle d'étude de prédilection car il recherche un animal anatomiquement simple et facile à manipuler pour pouvoir établir les bases génétiques et moléculaires du développement. Dans son laboratoire au Medical Research Council (MRC) de Cambridge, S. Brenner va développer les outils génétiques permettant d'utiliser C. elegans comme modèle. En 1967 il expose des nématodes à l'EMS (Ethyl Methane Sulfonate), un puissant agent chimique mutagène et commence ce qu'il appelle sa première « chasse aux mutants! » (Brenner, 1974). A partir des nombreuses constantes qui caractérisent cet animal, il isole de nombreux mutants dont le premier est nommé dumpy (signifie boulot) car il est plus petit et plus large que la souche sauvage. Il publiera en 1974 « The genetics of Caenorhabditis elegans » (http://wormbase.sanger.ac.uk/papers/31 Brenner74.pdf) (Brenner, 1974), où il décrit la méthode qui lui permit l'étude de près de 300 mutants et la cartographie de 100 gènes. Ces travaux sont toujours cités comme LA référence en génétique de C. elegans car ils posent les bases de l'analyse génétique chez ce nématode. La force dans le travail de S. Brenner tient au fait qu'il va parvenir à mobiliser autour de ce modèle toute une communauté de biologistes qui vont, grâce aux atouts de cet animal, rapidement faire avancer la compréhension de ce nématode mais aussi de certains processus communs aux eucaryotes. La généalogie des chercheurs qui dans les laboratoires à travers le monde travaillent sur C. elegans a été faite et la racine commune les ramène à S. Brenner.

#### **Anatomie et physiologie**

### Un animal au mode de vie adapté au travail en laboratoire

C. elegans est un organisme modèle utilisé en biologie depuis plus de 40 ans. L'étendue des connaissances obtenues grâce à cet animal va des mécanismes de l'apoptose (Ellis and Horvitz, 1986) jusqu'à la machinerie moléculaire de l'ARN interférence (Fire et al., 1998) en passant par les neurosciences (Bargmann, 1993), le développement (Rocheleau et al., 1997), les voies de signalisation (Shen et al.. 2001), la résistance aux stress (Freedman et al., 1993), les maladies génétiques humaines (Driscoll and Gerstbrein, 2003) et plus récemment les interactions hôte-pathogène (Sifri et al., 2005, Irazogui et al., 2010, Kurz and Ewbank. 2003).

Dans la nature, ce ver qui mesure environ 1 mm de long à l'âge adulte se trouve dans le sol ainsi que sur les fruits en décomposition où il se nourrit de microorganismes (Barrière and Felix, 2006).

Son mode de nutrition et sa petite taille font qu'il est facile à cultiver. En laboratoire, les animaux sont élevés dans des boîtes de pétri sur un milieu gélosé ensemencé avec une souche de bactéries Escherichia coli souche OP50 (Riddle et al., 1997) (Figure 1). Les températures optimales de culture de ces nématodes sont comprises entre 15 °C et 25 °C. C. elegans a un mode de reproduction particulier: c'est un animal hermaphrodite autofécondant. Cette spécificité est extrêmement précieuse au laboratoire car il est ainsi possible d'obtenir une population clonale à partir d'un seul individu homozygote pour un caractère considéré. Bien que majoritairement hermaphrodite (figure 2), il existe néanmoins des mâles dont la fréquence dans la nature est estimée entre 0.1 et 0.2 % (figure 3). Les mâles sont le produit d'une « erreur » dans la répartition des chromosomes X à la méiose.

Sous la lumière du microscope, *C. elegans* apparaît relativement transparent et son anatomie est à première vue simple (figures 2 et 3). La bouche de l'animal donne sur le pharynx dont le rôle est d'aspirer pour amener la nourriture vers le broyeur. Constitué de chitine, il transforme la

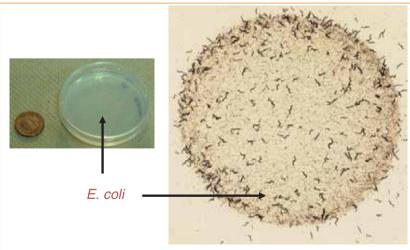


Figure 1 : Culture de C. elegans. A gauche ; boîte de Pétri contenant un milieu gélosé ensemencé avec E. coli, la bactérie qui sert de nourriture à C. elegans . A droite ; vue grossie du tapis bactérien sur lequel C. elegans est cultivé.

nourriture en un lysat qui passe ensuite dans l'intestin où il est assimilé. Les bactéries ingérées sont donc détruites et ne passent pas intactes la barrière du broyeur. La fin de l'intestin débouche sur le rectum dans la partie postérieure du nématode. Chez l'hermaphrodite, la gonade possède deux bras qui sont réparties dans la partie antérieure et postérieure de l'animal. Chacune débouche sur une poche contenant le sperme produit

même est reliée à l'utérus (figure 2). Par conséquent, les oocvtes se différencient en progressant dans la gonade puis entrent en contact avec le sperme de l'animal. L'œuf ainsi fécondé démarre son développement avant d'être pondus moins de 10 heures plus tard. En ce qui concerne le mâle, son système reproducteur présente une gonade unique qui contient le sperme (figure 3). Elle aboutit sur un cloaque commun avec l'anus. Des excroissances dans la partie postérieure forment un éventail criblé de terminaisons nerveuses qui facilite la reproduction avec l'hermaphrodite. Malgré le caractère autofécondant, la reproduction entre les mâles et les hermaphrodites donne une descendance à la ségrégation

par l'animal : la spermathèque qui elle

Une coupe transversale d'un hermaphrodite adulte révèle une structure en tubes intriqués (figure 4). L'animal est entouré et protégé par une cuticule faite d'un maillage de collagènes, protéines sécrétées par un tissus sous iacent. l'épiderme de *C. elegans*. Sous et contre cet épiderme se trouvent des faisceaux de muscles ainsi que des cordes nerveuses. L'intestin et les gonades sont relativement au centre, baignés dans un fluide appelé liquide pseudocoelomique.

Mendélienne car les gamètes du mâle

prennent le dessus sur le sperme de l'hermaphrodite. Cette particularité permet des approches en routine de

génétique classique.

La prolifération de cet animal est importante et rapide. A 20 °C, il ne faut que 3 jours à un œuf pondu par un adulte pour donner à son tour un adulte capable de pondre des œufs. La croissance d'un individu se fait au travers de mues successives qui rythment les 61

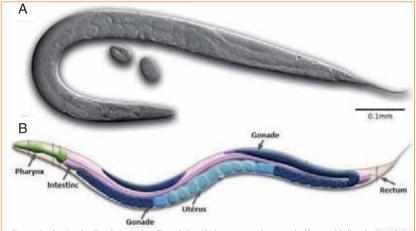


Figure 2: Anatomie d'un hermaphrodite adulte. (A) Image en microscopie Nomarski d'un hermaphrodite adulte et de deux embryons. (B) Schéma de l'anatomie d'un hermaphrodite adulte (vue latérale gauche). Adapté de wormatlas (http://www.wormatlas.org/).

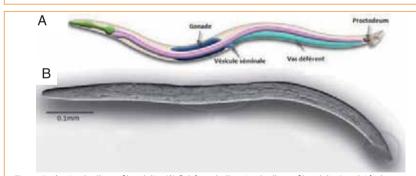


Figure 3 : Anatomie d'un mâle adulte. (A) Schéma de l'anatomie d'un mâle adulte (vue latérale gauche). (B) Image en microscopie Nomarski d'un mâle adulte. Adapté de wormatlas (http://www.wormatlas.org/).

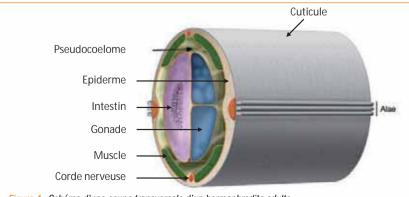


Figure 4 : Schéma d'une coupe transversale d'un hermaphrodite adulte. Adapté de wormatlas (http://www.wormatlas.org/).

4 stades larvaires. Chaque adulte peut pondre environ 300 œufs et ceci en seulement 5 jours. Par conséquent, un nématode peut engendrer en 10 jours une population de 90 000 animaux génétiquement identiques.

Dans les conditions standards de laboratoire, les vers de génotype sauvage peuvent vivre jusqu'à 20 jours mais il existe des mutations poussant cette limite à plus de 100 jours. Le plus remarquable est que les gènes dont les mutations accroissent la durée de vie du ver sont conservés chez les mammifères (Kenyon, 2010) ce qui rend ce domaine de recherche très actif dans la communauté des utilisateurs de *C. elegans*.

### De nombreuses constantes servent de repères

Un des intérêts majeur de ce nématode provient de sa constance tant d'un point de vu anatomique qu'au niveau de ses cycles. L'hermaphrodite contient exactement 959 noyaux de cellules somatiques dont précisément 302 appartiennent à des neurones. Le lignage cellulaire est invariant et a été identifié (Sulston et al., 1983). Cela signifie que la parenté ainsi que la position de chaque cellule sont identiques d'un individu à un autre. Cette particularité a permis à John White (collaborateur de S. Brenner) et son équipe de reconstruire le système nerveux du nématode à partir de coupes sériées de vers et d'observations en microscopie électronique (White et al., 1986). Les positions et les connexions entres chaque neurones ont été déterminées même si la densité de ces derniers au niveau du pharynx a rendu la tache complexe. Ces cartes du système nerveux de *C. elegans*, auxquelles

s'ajoute la possibilité de faire des ablations spécifiques de cellules à l'aide d'un laser, sont des outils précieux pour étudier et comprendre des mécanismes liés à la locomotion, la mécanosensation, la chémosensation ou encore la thermosensation de cet animal. Il n'y a pas que d'un point de vue morphologique que ces animaux sont constants. La vie d'un ver est en effet régie par de nombreux cycles qui sont autant de standards qui attestent de la bonne santé de l'animal. Par exemple, le broyeur se contracte 3 fois par seconde pour casser les particules de nourriture et la défécation se produit 1 fois toute les 45 secondes. L'hermaphrodite, à un certain âge, pond 6 œufs par heure et le mouvement de l'animal dans un liquide implique 120 ondulations par minute (Wong et al., 1995). De même, le temps de développement, les périodes entre chaque mues ainsi que la durée de vie sont aussi des constantes extrêmement utiles pour caractériser un mutant ou une réponse à de nouvelles conditions. De part la régularité dans son développement, il est possible de synchroniser des populations à très grande échelle de manière à s'astreindre des différences d'âge entre individus. A plus petite échelle, il est aussi possible de sélectionner des individus d'un stade spécifique car ils présentent des particularités morphologiques tel que le quatrième stade larvaire qui possède une zone plus claire en forme de croissant de lune qui préfigure la vulve en devenir.

#### **Techniques et outils**

### De nombreux mutants présentent des phénotypes remarquables

des phenotypes remarquables Les constantes de forme, d'activité ou de temps de développement ont été dès le début de l'utilisation du nématode des atouts précieux pour démarrer la génétique. De nombreux mutants ont rapidement été isolés sur la base de phénotypes flagrants tels que des défauts locomoteurs (mutants unc: UNCoordinated), des tailles aberrantes (mutants sma: SMAII ou lon: LONg) ou encore un rythme de ponte anormal (mutants egl: EGg Laying defective). Ces mutants aux phénotypes évidents en comparaison avec les standards des animaux sauvages sont devenus autant de marqueurs génétiques localisés sur les 6 chromosomes de C. elegans (5 autosomes et 1 chromosome sexuel). Les travaux de S. Brenner que nous avons déjà évoqué ont permis d'initier l'élaboration d'une carte génétique qui a été la pierre angulaire faisant de C. elegans un modèle précieux en biologie. Cette ressource ouvre la porte aux approches génétiques par mutagénèse qui font parties de ces techniques de choix permettant d'aborder une problématique biologique de manière non-biaisée.

### Les vers se conservent par congélation

Un avantage plus que conséquent du modèle nématode concerne la conservation et le maintient à long terme des souches ou des mutants obtenus. En effet, les nématodes peuvent êtres congelés et sont conservés à -80 °C ou dans de l'azote liquide. Mise au point par John Sulston, la congélation se fait dans une solution à base de glycérol. Même si les résistances au procédé varient, tous les stades larvaires sont congelables et seuls les œufs ne résistent pas. Après décongélation certains animaux vont

se réveiller en à peine quelques minutes et pondre le jour suivant. Le rythme de ponte de l'animal suffit à reformer des populations complètes en quelques jours à partir d'un seul animal. Si cette méthode est correctement mise en œuvre elle permet de récupérer la majorité des animaux traités. Les possibilités de stockage des souches de nématodes sont poussées à leur extrême au Caenorhabditis Genetic Center (CGC) qui possèdent plus de 12,000 souches de *C. elegans* (mutants, lignées transgéniques,...). De plus, tout laboratoire peut envoyer ses souches au CGC qui se chargera de les stocker et de les distribuer aux autres équipes selon leurs demandes (http://www. cbs.umn.edu/CGC/strains/). Cette centralisation, lisibilité et libre distribution du matériel biologique est un immense avantage pour accélérer le travail et éviter les redondances.

### Plus de mutants générés que de gens pour les caractériser

Le criblage génétique est une approche très précieuse pour la compréhension globale d'un mécanisme biologique. Cette technique, qui vise à modifier le génome pour altérer le phénotype des organismes, permet d'identifier les gènes requis pour un processus déterminé mais aussi les séquences promotrices, les enhancers, les sites d'épissage ou encore les régions 3' UTR nécessaires à la bonne expression et à la régulation du gène ciblé. De manière à obtenir une vision complète du mécanisme d'intérêt, il faut en théorie pouvoir modifier chacun des gènes de l'organisme ce qui implique de manipuler une très grande quantité d'animaux. L'idéal est d'atteindre un niveau théorique de mutation de l'ordre de la saturation du génome. Le nématode est particulièrement adapté à ces approches par son caractère hermaphrodite autofécondant, sa taille et son faible coût. En effet, 1 million d'animaux mutagénisés et prêts à être testés pour un phénotype donné sont aisément obtenus en quelques semaines, contenus dans seulement 20 boîtes de Pétri et ceci pour un coût équivalent à celui d'une souris. De plus, les très bonnes connaissances dont nous disposons sur l'anatomie et la physiologie de cet animal favorisent le développement de cribles génétiques qui portent notamment sur la locomotion. le comportement ou le développement. Cette facilité de mutagénèse et de crible incite très souvent les laboratoires a utiliser ces techniques dans leurs projets de recherche. L'animal pouvant se congeler, les congélateurs de ces laboratoires contiennent de nombreux mutants qui nécessiteront le travail de beaucoup de collaborateurs sur plusieurs années. Les études réalisées par l'équipe de Robert Horvitz, qui travailla un temps avec S. Brenner, sont une bonne illustration de l'utilisation des cribles génétiques. C'est à partir de la connaissance du lignage cellulaire de C. elegans qu'ils ont identifié par mutagénèse des animaux avec des défauts de différenciation ou des cellules surnuméraires. Parmi ces nombreux mutants se trouvaient une lésion dans le gène ced-3 qui s'est avéré être un homologue du gène humain codant la caspase-1. Cette découverte chez le ver a démontré le contrôle génétique de l'apoptose et a grandement éclairé les découvertes de ces voies de sianalisation chez les mammifères (Yuan et al., 1993).

### Des animaux transgéniques en une semaine

La transparence des animaux est un atout maieur pour l'observation de patrons d'expression cellulaire. Il est relativement aisé de créer des animaux génétiquement modifiés qui contiennent tout ou partie du gène concerné ainsi qu'un fluorochrome comme la Green Fluorescent Protein (GFP) (Chalfie et al., 1994). De plus, de nombreuses expériences nécessitent le sauvetage d'une mutation par réintroduction de la version sauvage ou plus simplement la surexpression d'un gène d'intérêt ou son expression ectopique. Toutes ces approches, qui nécessitent l'introduction de matériel génétique pour établir des lignées transgéniques, sont effectuées en routine avec C. elegans. Différentes méthodes existent mais la plus courante, développée en 1991 par Craiq Mello (Mello et al., 1991), consiste, à l'aide d'un fin capillaire de verre, à injecter le matériel génétique directement dans les gonades des hermaphrodites. Moins d'une heure est nécessaire à l'injection d'une vingtaine d'animaux et une semaine d'attente est requise pour l'identification de lignées stables issues de la deuxième génération. Tous les types d'acides nucléigues allant des ARNs au produit PCR en passant par les chromosomes artificiels peuvent êtres injectés. L'ADN injecté est transformé par le nématode en un extrachromosome contenant de multiples copies du produit. De part l'absence de zone centromérique spécialisée sur les chromosomes du ver, l'extrachromosome est reconnu comme matériel endogène à la mitose par la machinerie réplicative du nématode.

Les constructions portées par les lignées ne sont généralement pas intégrées et l'association d'un marqueur de co-injection est nécessaire pour attester de la présence du transgène d'intérêt. Ces marqueurs sont généralement des modificateurs de la morphologie du ver ou permettent de produire de la fluorescence. Récemment, des marqueurs de co-injection procurant une résistance à un antibiotique ont été développés. Ceci permet une sélection tout comme avec les bactéries ou les cellules eucaryotes (Giordano-Santini et al., 2010, Semple et al., 2010). Une étude récente illustre particulièrement bien la facilité d'obtention des lignées transgéniques ainsi que les avantages associés à la transparence du ver. Denis Dupuy et ses collaborateurs ont généré 900 souches transgéniques comportant les promoteurs de 900 gènes fusionnés à celui codant la GFP. Par l'analyse de l'expression de la GFP le long des animaux au cours du temps (voir plus bas l'explication concernant le trieur de nématode), ils ont déterminé non seulement le patron d'expression spatial mais aussi temporel de ces différents promoteurs (Dupuy et al., 2007). Un transgène étant rarement transmis à 100 % de la descendance, il est possible d'intégrer les constructions dans le génome du ver pour pleinement utiliser ces animaux. Cette intégration se fait de manière aléatoire en exposant les nématodes transgéniques à des rayonnements gammas qui provoguent d'importants dommages dans l'ADN. Si l'animal survit après réparation de son matériel génétique, il est possible que le transgène soit intégré au génome. Tout n'est qu'une histoire de nombre et plusieurs lignées intégrées sont généralement obtenues à partir de 500 animaux analysés. Les mutations provoquées par le traitement sont ensuite éliminées par des croisements successifs avec des vers de génotype sauvage. Les lignées ainsi stabilisées avec un fond génétique nettoyé sont obtenues en 1 mois et peuvent êtres utilisées pour des applications à grande échelle.

#### C. elegans est un organisme multicellulaire au génome séquencé et annoté

Le nématode étant rapidement devenu un modèle reconnu et relevant pour la biologie, d'importants efforts ont été fournis au sein de la communauté des laboratoires utilisant le nématode pour finaliser le séquençage de cet invertébré et fournir une annotation compréhensive de ses 6 chromosomes. Initiée par le biologiste anglais J. Sulston en collaboration avec Robert Waterston, qui a dirigé le travail de séguençage à l'université de Washington, la séguence complète du génome de C. elegans fut publiée en 1998 (T. C. S. C., 1998). Ce travail constitue le premier décryptage de l'ADN d'un métazoaire, les séguencages précédant ayant concerné la bactérie *Haemophilus influenzae* en 1995 et la levure Saccaromyces cerevisiae en 1997. En terme de chiffres, le génome du nématode est constitué de 100 Méga bases (3 Giga bases pour l'homme) avec environ 20 000 gènes (30 000 pour l'homme) annotés. Les comparaisons entres les différentes séquences disponibles ont rapidement soulignées la relevance du modèle nématode pour la compréhension de la biologie des mammifères car 74% des protéines humaines présentent des homologues chez le ver (T. C. S. C., 1998). Certaines de ces ressemblances sont telles qu'elles stimulent des approches qui portent sur la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson chez le ver (Driscoll and Gerstbrein. 2003). Ces maladies humaines sont en partie liées à une accumulation de protéines qui forment des agrégats toxiques pour la cellule et de tels symptomes peuvent êtres induits chez le ver en surexprimant dans certaines cellules le prototype de ces molécules. Ces protéines sont fusionnées à la GFP et la transparence du nématode permet de visualiser directement la formation ou la dissolution de ces aggregats chez les animaux transgéniques. Il est ainsi possible d'effectuer des cribles génétiques pour identifier des facteurs aggravants ou protecteurs ainsi que d'utiliser ces nématodes comme plateforme in vivo pour tester l'effet de certaines molécules ou drogues (Choe and Strange, 2008).

#### Inactivation direct d'un gène ou de son produit, oui ; KO ciblé, non

Une autre approche qui découle directement de l'obtention de la séquence génomique de C. elegans est la génétique inverse. Les comparaisons de gènes entres espèces et le recoupement des travaux effectués chez différents organismes permettent d'attribuer une fonction putative à de très nombreux produits de gènes du nématode. Pour tester la fonction d'un gène dans l'animal, il faut pouvoir supprimer ce gène ou le produit de ce gène. L'approche reine qui chez la souris consiste a enlever tout ou partie d'un gène ciblé (Knock Out) n'est que très peu efficace chez le ver. Par contre, des couples d'oligonucléotides peuvent êtres définis pour tester la présence et l'état du gène d'intérêt par PCR (Polymerase Chain Reaction). Il est donc possible de contrôler la présence de délétions dans une population traitée aux rayons ultraviolets. Certains laboratoires (http://www.shigen. nig.ac.ip/c.elegans/index.isp et http:// celeganskoconsortium.omrf.org/) dédient une part de leur temps à la génération de population de mutants qu'ils testent pour la présence de délétions spécifiques selon demande. Ces mutants sont envoyés au laboratoire demandeur ainsi qu'au CGC (voir plus haut). Néanmoins, il n'y a aucune garantie de délai concernant l'identification d'une délétion dans le gène d'intérêt. De plus, une banque de mutants composée d'animaux avec un transposon inséré dans le génome a été générée (Duverger et al., 2007). La position des transposons est identifiée et les nématodes congelés sont envoyés sur demande (http://pbil.univlyon1.fr/segalat/data/mos.php). Récemment, une technique de recombinaison homologue a été développée à partir de ces mutants dans le but d'insérer un fragment d'ADN à proximité du site d'insertion du transposon (Robert and Bessereau, 2007). En complément, il existe une méthode rapide pour supprimer spécifiquement des transcrits ; l'ARN interférence (ARNi). Ce mécanisme initialement identifié chez les plantes (Ecker and Davis. 1986) a été compris d'un point de vue mécanistique grâce aux travaux chez le nématode (Tabara et al., 1999). Son utilisation pour inactiver spécifiquement le produit de n'importe quel gène a révolutionné l'étude de la biologie de C. elegans ainsi que d'autres espèces. Il fallait initialement injecter dans la gonade des vers de l'ARN double brins spécifique d'un gène pour observer une disparition des transcrits correspondants dans les animaux traités ainsi que leur descendance et ainsi simuler une mutation perte de fonction (Timmons and Fire, 1998). Une autre alternative consistait à tremper les nématodes dans une solution enrichie en ARN double brins. Finalement, une troisième technique a été mise au point pour laquelle il suffit de nourrir les vers avec des bactéries qui produisent l'ARN double brins pour observer une très forte diminution de la quantité de transcrits correspondants (Fraser et al., 2000). Sur ce principe et en utilisant les ressources associées au séquençage, le laboratoire de Julie Ahringer (Cambridge, Angleterre) a construit des banques de bactéries où chaque clone permet de cibler spécifiquement un gène de *C. elegans*. Des banques qui couvrent plus de 80 % du génome du nématode sont disponibles et permettent de faire des criblages de perte de fonction « génome complet » (Kamath and Ahringer, 2003). Les travaux récents de l'équipe de Todd Lamitina sur le stress osmotique illustrent bien les outils décrits précédemment. A partir d'animaux transgéniques qui deviennent fluorescents uniquement dans un contexte de stress, ce groupe de recherche a effectué l'ARNi de 16,000 gènes sur ces nématodes. Ils ont identifié des gènes dont la perte de fonction induit un stress chez l'animal (animal fluorescent) alors que l'environnement n'est pas stressant. Les gènes mis en évidence codent des protéines de systèmes régulateurs impliqués dans le maintient de l'homéostasie protéique du nématode (Lamitina et al., 2006).

#### De nombreuses ressources sur internet pour partager découvertes et matériels

Toujours dans l'esprit de la diffusion des ressources et des connaissances au sein de la communauté des utilisateurs de *C. elegans* et au-delà, de nombreux sites sur internet sont dédiés à la recherche sur le nématode. Le plus utilisé d'entre eux est certainement le site « wormbase » (http://www.wormbase.org) qui présente la carte physique du génome de C. elegans ainsi que quantité d'informations sur les mutants disponibles, les expériences effectuées ainsi que la bibliographie correspondante. Ce site est le point d'entrée vers d'autres ressources telles que « wormbook » (http://www.wormbook.org/) ou « wormatlas » (http://www.wormatlas.org/). Le premier est un livre numérique qui traite de nombreux aspects de la biologie ou de l'utilisation de C. elegans tandis que le second est un atlas numérique de l'anatomie du ver conçu à partir de coupes sériées analysées par microscopie électronique. Les patrons d'expression de nombreux gènes sont aussi décrits et aident à l'identification cellulaire. Dans cette thématique, il est intéressant de noter le site d'un consortium qui détermine systématiquement les patrons d'expressions des gènes de C. elegans et dont les images sont accessibles au travers d'un moteur de recherche qui tri par tissu, stade de développement ou nom de gène (http://gfpweb.aecom.yu.edu/index).

#### Divers aspects de la biologie sont étudiables avec *C. elegans*

#### Des possibilités rapidement démontrées

La simplicité de ce modèle à favorisée l'émergence d'incroyables découvertes biologiques et technologiques qui ont bénéficié à des usages qui s'étendent bien au-delà du nématode. A ce jour ce ne sont pas moins de 65

3 prix Nobel qui ont récompensés 6 scientifiques et leurs équipes pour leurs travaux directs sur C. elegans. Le prix Nobel de physiologie ou de médecine attribué en 2002 à S. Brenner, J. Sulston et R. Horvitz a souligné les atouts du modèle nématode à travers leurs découvertes qui concernent la régulation génétique du développement des organes et la mort cellulaire. Ce prix prend en compte les efforts avant permis l'établissement de l'animal comme modèle en biologie, l'étendue des connaissances sur sa physiologie et les découvertes avant une relevance pour tous les animaux, résultats qui découlèrent en grande partie de cribles génétiques. En 2006, ce fut au tour d'Andrew Fire et C. Mello de se voir décerner ce prix pour leurs travaux sur l'interférence par ARN. Bien qu'observée depuis longtemps chez les plantes, sous le terme de co-suppression, lors notamment de la surexpression de transgènes (Ecker and Davis, 1986), la compréhension des bases moléculaires de ce phénomène attendit l'utilisation du nématode. Partant du principe que l'ARNi est très efficace chez le nématode, C. Mello et A. Fire ont mis en place des cribles génétiques pour identifier des animaux résistants à l'ARNi. Pour avoir un phénotype robuste, ils ont traité des populations mutagénisées par l'EMS avec un ARNi qui entraine une létalité embryonnaire. Par conséquent, seuls les mutants résistants à l'ARNi sont capables d'avoir une progéniture. Cette approche astucieuse et les études qui en ont découlé ont posé les bases moléculaires de l'ARNi, processus qui s'est révélé hautement conservé chez les eucaryotes (Tabara et al., 1999). Plus récemment en 2008 Martin Chalfie.

Osamu Shimon et Roger Y. Tsien ont reçus le prix Nobel de chimie, pour la découverte et le développement de la Green Fluorescent Protein (GFP) comme outils en biologie. Découverte dans les années 1970 par 0. Shimura la GFP n'a été cloné et séquencé qu'en 1992. Le laboratoire de R.Y. Tsien n'a cessé d'améliorer et de modifier la GFP pour créer de très nombreux fluorochromes actuellement utilisées par tous les laboratoires. M. Chalfie qui travaillait déjà sur C. elegans a compris le potentiel de la combinaison entre cette molécule et le nématode transparent. Il a alors effectué les premières expériences d'expression hétérologue de cette protéine chez l'animal et ouvert la voie aux études de patrons d'expression et aux approches par gène rapporteur (Chalfie et al., 1994).

D'autres résultats obtenus grâce à ce modèle sont tout aussi remarquable tel que l'identification des microARNs (miARN). Ils furent découverts en 1993 par Victor Ambros, Rosalind Lee et Rhonda Feibaum lors d'une étude sur un mutant de *C. elegans* présentant un défaut dans son lignage cellulaire. Ce défaut était lié à une mutation dans la partie non codante d'un gène (3' UTR du gène lin-14), séquence nécessaire à l'interaction avec un miARN (Lee et al., 1993). Le miARN correspondant (lin-4) fut le premier découvert mais il fallut attendre l'année 2000 et l'identification du miARN let-7 dont la séquence est conservée dans de nombreuses espèces pour réaliser que le mécanisme de régulation par les miARN est aussi présent chez les mammifères (Pasquinelli et al., 2000). Le monde des miARN est désormais en pleine effervescence tant ces petits acides nucléiques semblent impliqués

dans de nombreux mécanismes de régulations transcriptionnelles ou traductionnelles (Bartel, 2009).

Vers une meilleure compréhension des infections grâce au nématode Comme décrit précédemment, C. elegans est un modèle de choix pour décrypter les mécanismes du développement embryonnaire, de l'apoptose ou encore de la signalisation neuronale. Deux types d'approches vont étendre le spectre d'utilisation des invertébrés dont le nématode aux maladies infectieuses ainsi qu'à la dissection de l'immunité innée. Le premier type de travaux est effectué avec la drosophile et a pour cadre la réponse immunitaire innée. L'équipe de Jules Hoffman à Strasbourg détermine en 1996 que le récepteur transmembranaire TOLL identifié 10 ans auparavant pour son rôle dans l'orientation de l'axe dorso-ventrale de l'embryon de drosophile (Anderson et al., 1985) est crucial pour la synthèse de peptides antimicrobiens chez cette mouche suite à une infection fongique (Lemaitre et al., 1996). Cette découverte va trouver un écho retentissant auprès des immunologistes avec la découverte de récepteurs équivalents chez les mammifères, les TLR (Toll Like Recepteurs) (Medzhitov et al., 1997). Chez la souris et l'homme notamment, ce sont ces récepteurs qui perçoivent les pathogènes, activent l'immunité innée et orchestrent la réponse adaptative qui suivra à travers la régulation de la synthèse d'interférons ou de cytokines (Palm and Medzhitov, 2009). Les travaux qui ont suivi ont démontré des similitudes inattendues entres les cascades de signalisation qui aboutissent à la synthèse des peptides antimicrobiens chez cet invertébré et les voies de signalisation en aval des TLRs des mammifères. Ces résultats obtenus avec un insecte et leur relevance pour les mammifères ont ouvert les yeux des biologistes sur la conservation inter-espèces de processus autres que la transcription, la traduction ou la réplication. Dans le même temps, l'équipe de Frederick Ausubel à Boston travaille a l'identification de facteurs de virulence bactériens. Cette équipe part du principe que des pathogènes avec un large spectre d'hôte allant des plantes aux mammifères utilisent certainement un même lot de facteurs de virulence et ceci quel que soit l'hôte : c'est le principe des facteurs de virulence universels. L'équipe de F. Ausubel par exemple détermine qu'il est possible d'utiliser la plante comme premier modèle hôte pour identifier par crible génétique des facteurs de virulence de la bactérie pathogène Pseudomonas aeruginosa qui sont aussi requis pour l'infection chez la souris (Rahme et al., 1995). Ce groupe décide ensuite d'utiliser le nématode comme hôte pour l'identification de facteurs de virulence microbiens, travaux qui s'avèrent relevant pour les mammifères (Mahajan-Miklos et al., 1999). Ces découvertes, associées à l'existence d'une importante famille de pathogènes humains avec un large spectre d'hôte (P. aeruginosa, Serratia marcescens, Burkholderia pseudomallei,...), ont ouvert la voie à de nombreuses études (Kurz et al., 2003, Gan et al., 2002) dont les cribles de molécules potentiellement antimicrobiennes avec le ver comme modèle hôte pour l'infection (Breger et al., 2007). Finalement, les modèles d'infections caractérisés avec le nématode ont permis d'analyser la réponse

du ver et de mettre en évidence une immunité innée inductible dont les éléments des voies de signalisation sont conservés inter-espèces (Kim et al., 2002, Mallo et al., 2002).

### Cas pratique : étude de l'immunité antifongique de *C. elegans*

Pour comprendre à quel point C. elegans est un modèle pratique et robuste, nous allons utiliser l'historique des expériences menées sur l'immunité antifongique de C. elegans dans le laboratoire de Jonathan Ewbank (CIML, Marseille). Les étapes qui ont permis les évolutions dans ce domaine seront illustrées par des détails sur les protocoles types ainsi que par quelques exemples de résultats marquants. En effet, même si le questionnement change selon le sujet de recherche qui motive l'utilisation du modèle C. elegans, les outils employés restent sensiblement constants et sont le reflet du potentiel de ce modèle.

L'exploitation qui peut être faite de C. elegans en tant que modèle pour l'étude de l'immunité innée nécessite tout d'abord que l'on définisse quels types de microorganismes peuvent infecter ce vers (Couillault and Ewbank, 2002). Depuis bien longtemps des champignons qui infectent des nématodes (nématophages) sont connus et décrits comme pathogènes naturels des nématodes (Barron, 1976, van den Boogert et al., 1992). Leur variété est grande, leurs stratégies infectieuses tout aussi variées et dans tous les cas les nématodes sont pour eux une source nutritive. Certains de ces champignons sont capables de capturer les nématodes grâce à de véritables lassos constricteurs, d'autres via de petites structures adhésives qui piègent les nématodes qui s'en approchent. Le

choix du laboratoire de J. Ewbank s'est porté en 1999 sur le champignon Drechmeria coniospora car quelques études décrivaient déjà ce champignon comme pathogène des nématodes tels que C. elegans (Coles et al., 1989). L'objectif était d'obtenir une infection standardisée pour effectuer des approches de génétique et de transcriptomique sur l'hôte. D. coniospora est définit comme un champignon nématophage strict qui infecte grâces à des spores d'environ 8µm de long. Ces spores ont une forme de massue et présentent à leur extrémité apicale une structure adhésive qui leur permet d'adhérer à la cuticule des nématodes (figure 5). Chez *C. elegans*, l'adhésion se produit préférentiellement autour de la bouche et de la vulve. Ainsi collées aux vers, les spores vont germer pour permettre la croissance des hyphes (système végétatif du champianon) qui vont perforer sa cuticule puis traverser l'épiderme sous-jacent pour finir par envahir le corps entier de l'animal ce qui entraine sa mort. Après 24h, l'animal ne constitue plus une source nutritive suffisante pour le champignon qui entre alors dans un nouveau cycle de sporulation pour permettre sa dissémination. Pour mettre en évidence les mécanismes de défense de C. elegans, l'utilisation de D. coniospora présente plusieurs avantages. D'une part, ce système infectieux est non problé-



Figure 5 : Image en microscopie optique de spores de Drechmeria coniospora. La flèche montre l'extrémité adhésive de la spore

matique pour le manipulateur puisque ce champignon n'est pathogène que des nématodes. D'autre part, l'infection par ce champignon implique que le régime alimentaire du ver ne change pas à la différence des modèles infectieux qui utilisent les bactéries. En effet, les infections bactériennes se produisent majoritairement suite à une administration par ingestion ce qui peut rendre difficile la distinction entre mécanismes de défenses et ce qui peut être imputé à des problèmes nutritifs.

#### Méthodes pour évaluer la pathogénicité d'un microorganisme envers le nématode

Une méthode simple pour évaluer la virulence d'un microbe potentiellement pathogène (bactérie, champignon) est de mesurer le temps de survie des vers en contact avec cette souche. Cette survie suite à l'exposition au microbe d'intérêt est comparée avec celle obtenue en nourrissant les vers avec la souche d'E. coli (OP50) de référence utilisée dans les laboratoires pour la culture de *C. elegans*. Comme D. coniospora ne sert pas de nourriture au nématode, des spores sont mélangées à la nourriture du ver qui est infecté par simple contact avec celles-ci. Ces études de survie sont facilitées par le grand nombre de nématode que l'on peut utiliser, par leur homogénéité en termes de génotype ainsi que par leur synchronisation. Ces cinétiques de survie nous ont permis de déterminer que l'infection par *D. coniospora* tue tous les vers en moins de 3 jours alors que les nématodes non infectés peuvent vivre 20 jours (Couillault et al., 2004). Au-delà de la survie qui est le résultat d'une combinaison de nombreux facteurs, il est possible d'utiliser les connaissances sur la physiologie

du nématode pour détecter des perturbations durant l'exposition à certains microorganismes. Ces changements dans les cycles ou les comportements sont autant de phénotypes qui renseigneront sur la pathophysiologie.

## Analyser le transcriptome pour avoir une vue globale de la réponse de l'hôte

L'une des caractéristiques de la réponse d'un organisme à un stress ou à une infection réside dans l'induction de la transcription d'un certains nombre de gènes dont le produit va aider à l'adaptation à cette nouvelle situation. L'étude du transcriptome par puces à ADN qui permet de définir le niveau d'expression des gènes dans des conditions définies est possible chez le nématode car l'usage de C. elegans permet la production d'ARN par les techniques les plus courantes telles que des extractions au phénol-Chloroforme. Ces techniques d'analyses de transcriptome s'effectuent aujourd'hui en routine avec des puces à ADN désormais considérées comme « génome complet ». Combinées avec la richesse des banques de données qui concernent C. elegans, ces approches sont globales. efficaces et robustes. Nous avions déjà entrepris ce type d'approche pour mettre en évidence l'immunité antibactérienne du nématode (Mallo et al., 2002) et nous avons réutilisé la stratégie lors des infections par *D. co*niospora (Couillault et al., 2004, Wong et al., 2007). Plusieurs séries de puces à ADN, répétées à différents temps d'infection (12 et 24h post-infection) ont été réalisées et les résultats obtenus ont permis de classer les gènes selon deux catégories principales : les

gènes qui sont surexprimés et ceux qui sont sous-exprimés au cours de l'infection. L'analyse des gènes surexprimés a mis au jour entre autre des gènes codant des peptides d'une cinquantaine d'acides aminés. Ces peptides ont des séquences relativement identiques et ils sont codés par des gènes organisés sur deux loci distincts, le locus NLP pour Neuropeptides Like Peptides et le locus CNC pour CaeNaCin (nommé ainsi par le laboratoire Ewbank) (Pujol et al., 2008b, Couillault et al., 2004).

#### Certains gènes induits durant l'infection codent des peptides antimicrobiens

Pour déterminer la fonction biologique de ces peptides au cours de l'infection, l'un d'entre eux, NLP-31, a été synthétisé et la capacité de ce peptide d'inhiber la croissance de certains champignons et de bactéries a été mise en évidence par des tests in-vitro (Couillault et al., 2004). Un autre test a consisté à incuber des nématodes infectés par *D. coniospora* avec ce peptide de synthèse. Nous avons ainsi démontré que selon les concentrations de peptide utilisées, ce dernier pouvait permettre de stopper la croissance du champignon dans le nématode mais aussi bloquer sa sporulation. Cet exemple montre qu'il est tout à fait possible d'utiliser les modèles infectieux qui impliquent *C. elegans* comme hôte pour le criblage de molécules d'intérêts thérapeutiques telles que des drogues aux capacités antimicrobiennes (Moy et al., 2006). Pour preuve in-vivo de l'effet protecteur de ces peptides, des copies supplémentaires du locus codant la famille des NLPs ont été injectées chez le nématode. Les animaux transgéniques ainsi générés sont capables de produire ces peptides en plus grande quantité. Nous avons ainsi mis en évidence *in-vivo* que cette surexpression augmente la survie des nématodes suite à une infection par le champignon *D. conio-spora* (Zugasti and Ewbank, 2009, Pujol et al., 2008b).

#### L'induction de ces peptides renseigne sur l'état d'activation de l'immunité

Nous l'avons dit, la transparence de ce vers permet une visualisation précise de marqueurs tels que la GFP ce qui rend la stratégie d'utilisation des gènes rapporteurs particulièrement instructive. Pour cela la GFP est clonée en aval d'un promoteur d'intérêt puis cette construction est injectée chez le nématode pour créer des animaux transgéniques chez lesquels la synthèse de la GFP dépend de l'utilisation de ce promoteur (Chalfie et al., 1994). Après vérification par RT-PCR des résultats obtenus par puce à ADN, différentes lignées transgéniques furent générées que ce soit pour un peptide

de la famille NLP (gène de la GFP sous le contrôle du promoteur du gène nlp-29 : pnlp-29::GFP) ou pour la famille CNC (gène de la GFP sous le contrôle du promoteur du gène cnc-2 : pcnc-2::GFP). Dans les deux cas, nous avons constaté que la GFP est exprimée faiblement et de manière constitutive chez les animaux transgéniques. Cette expression se fait dans l'épiderme du vers situé sous la cuticule, premières cellules en contact avec le pathogène. Enfin, comme espéré, la fluorescence des animaux transgéniques augmente fortement dans ce tissu suite à l'infection par le championon (figure 6) (Couillault et al., 2004, Pujol et al., 2008a, Zugasti and Ewbank, 2009). Tout l'intérêt de posséder ce type d'animaux transgéniques réside dans le système rapporteur qui indique de manière robuste l'état d'activation d'une partie de l'immunité antifongique de l'animal. En effet, nous pouvons supposer que les gènes qui codent les peptides antimicrobiens sont les éléments les plus en aval d'une cascade de signalisation activée suite à une infection. Le champignon D. coniospora est l'activateur et les peptides antimicrobiens les effecteurs. Basé sur le principe d'une quantification de la GFP produite, ces animaux transgéniques sont donc des outils précieux pour la dissection des voies de régulation de l'immunité car ils présentent un phénotype robuste et reproductible. L'inactivation d'un gène, situé dans cette cascade de signalisation doit empêcher l'induction du transgène promoteur::GFP suite à l'infection. En revanche, si ce gène est un régulateur négatif de cette cascade, les animaux transgéniques seront fluorescents avant même leur infec-

tion (figure 7).

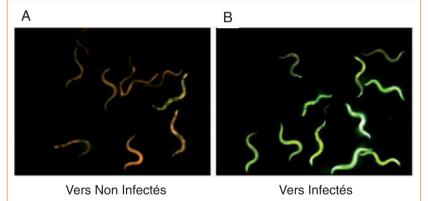


Figure 6 : Rapporteur fluorescent de l'immunité antifongique de C. elegans. Image de vers transgéniques non infectés (A) et infectés (B) en fluorescence. Ces animaux produisent constitutivement un fluorochrome rouge qui sert de marqueur de co-injection pour cette transgénèse. Les vers infectés expriment fortement la GFP qui est sous le contrôle d'un promoteur induit par l'infection.

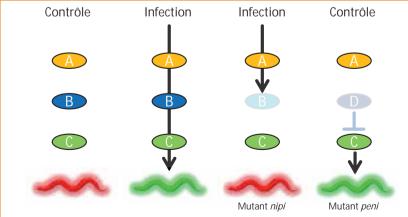


Figure 7 : Principe de l'utilisation d'un rapporteur pour disséquer les voies de signalisation situées en amont. Les animaux transgéniques non-infectés sont rouges et deviennent verts suite à l'infection et à l'activation de leur immunité innée. Des cribles génétiques peuvent permettre à partir de cet outil d'isoler des mutants qui ne répondent plus à l'infection (nipi) ainsi que des mutants ayant une immunité constitutivement active (peni).

#### Commencer la dissection des voies de signalisation avec une étude par gènes candidats

Un génome séguencé et annoté, des bases de données en libre accès, des banques de mutants disponibles et une bibliographie minutieuse du domaine d'intérêt sont plus que suffisant pour réaliser une étude par gènes candidats (génétique « reverse »). A ce stade du projet, plusieurs groupes de recherche avaient déjà clairement identifiés de nombreuses protéines comme des éléments clés de l'immunité innée des invertébrés ou des vertébrés. L'analyse du génome de C. elegans a révélé quelques homologues de la voie TOLL présente chez la drosophile et conservée chez les mammifères pour son rôle dans l'immunité (voies de siqualisation des TLRs). Ces protéines et les gènes qui les codent ont donc été de bons candidats pour tester leur rôle dans la synthèse des NLPs et des CNCs au travers de mutants existants ou d'ARNi et des rapporteurs fluorescents (Couillault et al., 2004). Une recherche bioinformatique en utilisant comme sonde le domaine TIR qui est une caractéristique des récepteurs TOLL a révélé deux protéines chez le nématode. La première est la protéine TOL-1 (Pujol et al., 2001), équivalente au récepteur transmembranaire TOLL de la drosophile et aux TLRs de mammifères et la deuxième est la protéine adaptatrice TIR-1, équivalente chez la drosophile à dSARM et chez les mammifères à la protéine SARM (Stérile Alpha and aRmadillo Motifs) pour laquelle l'implication dans une voie de signalisation des TLRs n'avait pas été démontrée. Par conséquent, un mutant homozygote de tol-1 a été croisé avec des nématodes transgéniques contenant le rapporteur p*nlp-29::GFP*  et suite à l'infection de la souche obtenue nous avons montré que le niveau d'expression du rapporteur GFP est équivalent à celui des vers transgéniques infectés de fond génétique sauvage. De plus, suite à une infection par *D. coniospora*, la cinétique de survie des vers sauvage est comparable à celle des vers mutants *tol-1*. Nous avons ainsi démontré que chez le nématode et dans nos conditions expérimentales, le récepteur TOL-1 n'est pas impliqué dans la synthèse des peptides antimicrobiens.

Concernant TIR-1, aucun mutant n'existait et nous avons donc choisis une approche par ARNi. Le génome de C. elegans code plusieurs isoformes de cette protéine et la technologie d'ARNi permet d'inactiver l'ensemble de ces isoformes à condition qu'ils aient des régions codantes communes. Nous avons donc réalisé une construction capable d'inactiver tous les isoformes de TIR-1 pour faire de l'ARNi par ingestion (voir précédemment). L'ARNi de *tir-1* sur des lignées contenant la construction pnlp-29::GFP a montré que ce gène est requis pour l'activation du rapporteur GFP suite à l'infection. En revanche, ce n'est pas le cas concernant les rapporteurs du locus cnc. De plus des nématodes traités par une ARNi de tir-1 survivent moins longtemps que des nématodes contrôles (Couillault et al., 2004, Zugasti and Ewbank, 2009). Nous avons ainsi démontré pour la première fois l'implication d'une protéine à domaine TIR dans la signalisation de peptides antimicrobiens de C. elegans. Suite à ces travaux publiés en 2004, une équipe américaine mit en évidence pour la première fois le rôle de la protéine SARM (équivalente à TIR de C. elegans) en tant que régulateur négatif dans la signalisation des TLRs chez les mammifères (Carty et al., 2006). C'est principalement par ces approches directes et ciblées que les éléments connus et impliqués dans l'immunité antibactérienne du ver tels que les voies de la p38 MAPkinase (Kim et al., 2002) et du TGF-beta (Mallo et al., 2002) furent démontrés comme nécessaires à la réponse antifongique chez le nématode (Couillault et al., 2004, Zugasti and Ewbank, 2009).

#### Criblage ARNi « génome complet » et mutagénèse pour une vue globale des voies de signalisation

Afin d'avoir une approche moins biaisée envers les éléments déià identifiés chez d'autres espèces, le laboratoire de J. Ewbank a initié en 2004 des cribles par mutagénèse EMS à partir de la souche transgénique possédant la construction p*nlp-29::GFP*. Les vers transgéniques mutagénisés par l'EMS permettent de réaliser des criblages basés sur la recherche de deux phénotypes majeurs. D'une part des animaux dits nipi (no induction of peptides after Drechmeria infection) qui ne produisent pas de GFP suite a l'infection par *D. coniospora* et d'autre part des animaux dits peni (peptide expression no infection) qui sur-expriment la GFP sans qu'il y ait infection par le champignon (figure 7). La première catégorie représente en théorie des régulateurs positifs des voies de signalisation tandis que la deuxième regroupe a priori des régulateurs négatifs des voies de transduction du signal.

A ce jour ces différents criblages nous ont permis d'obtenir une centaine d'allèles différents de vers *nipi* ou *peni*  et seuls quelques uns ont été caractérisés et mis en évidence en tant qu'acteurs essentiels dans la signalisation des peptides antimicrobiens (Pujol et al., 2008a, Ziegler et al., 2009, Lee et al., 2010).

L'identification du gène muté chez ces animaux peut se faire par deux méthodes. La première implique les principes de Mendel et Morgan et les techniques de cartographie génétique classique qui utilisent soit des marqueurs génétiques, soit des polymorphismes génétiques, soit les deux (voir http://www.wormbook.org/ toc wormmethods.html). Le résultat est que le gène muté est généralement identifié au bout de 3 à 12 mois. L'autre possibilité pour caractériser une mutation obtenue par EMS est de faire du séguencage direct à haut débit de tout le génome (Sarin et al., 2008). Cette technique récente nécessite un important travail d'analyse in-silico car même après avoir fait ce que l'on appelle un nettoyage du fond génétique suite à la mutagénèse, plusieurs mutations qui sont restées silencieuses pour le phénotype recherpeuvent êtres détectées. Néanmoins, le positionnement de la mutation peut être confirmé par cette méthode en 1 mois.

En complément des techniques de mutagénèse, la disponibilité de banque d'ARN interférant « génome complet » permet une approche qui même si elle ne cible que les gènes annotés reste néanmoins prometteuse. En effet, l'ARNi et la mutagénèse sont deux approches complémentaires car une mutagénèse peut affecter un gène essentiel à la croissance du vers et les animaux mutagénisés ne seront pas viables alors que l'ARNi permet de travailler à différents stades de développement ce qui permet de s'affranchir de ce type d'effets létaux. Par contre, une mutagénèse chimique va générer des mutants subtils par changement d'un acide aminé tandis que l'ARNi entraine essentiellement des pertes de fonction.

Travailler à l'échelle du génome avec l'ARNi nécessite de pouvoir réaliser des analyses à hauts débits. Pour cela, un outil très performant existe qui n'est autre qu'un trieur automatique de nématodes, machine développé par la société Union Biometrica (Etats-Unis). Ce trieur peut être comparé à un FACS car il permet d'analyser différents paramètres chez le ver tels que sa taille, son opacité ou sa fluorescence (Vert, Jaune, Rouge) et ceci à un rythme de plusieurs milliers d'individus à la minute. Cette machine permet ainsi de trier des populations, d'analyser leur niveau de fluorescence ou encore de distribuer des individus dans des plaques 96 puits. Cet instrument permet de grandement faciliter la sélection et le tri d'individus d'intérêt après une mutagenèse et va surtout s'avérer crucial pour l'analyse automatisée de nématodes exposées aux différents clones d'une banque d'ARNi. L'intérêt maieur de cette semi-automatisation réside dans le fait que toutes les données d'un animal concernant sa taille, son opacité ou sa fluorescence sont stockées et peuvent êtres analysées de diverses manières en temps voulu. Une telle approche par ARNi à grande échelle est actuellement en cours dans notre laboratoire et devrait permettre de tester avec notre rapporteur de l'immunité antifongique les 18 000 gènes du ver représentés par les clones ARNi en moins de 4 mois.

#### Un bon modèle, un complément ou une alternative?

Cette revue qui peut paraitre comme un plaidover en la faveur du nématode ne saurait être objective sans une présentation des approches qui ne fonctionnent pas, ne sont pas envisageables ou sont fastidieuses avec *C. elegans*. Tout d'abord, l'anatomie du ver limite les études aux fonctions des organes présents. Il faut en effet garder à l'esprit qu'en dépit de son caractère multicellulaire l'animal n'est pas composé de plus de 1000 cellules somatiques avec une absence de système circulatoire, de reins, de cœur ou de poumons. Il y a en revanche des muscles, des neurones ainsi que des épidermes. Cette anatomie simplifiée et compacte rend paradoxalement certaines analyses des organes présents plus difficiles car il est délicat d'extraire spécifiquement des cellules d'un tissu. Certains protocoles permettent d'isoler l'intestin ou les novaux d'embryon mais la dissection d'autres tissus ou cellules reste hasardeuse. Cette lacune peut dans certains cas tels que des purifications d'ARN ou de protéines devenir problématique si le gène d'intérêt ou son produit est exprimé dans plusieurs tissus à la fois. Il peut alors y avoir une importante perte de résolution dans l'analyse. Cette difficulté pour extraire spécifiquement des cellules est accompagnée par une absence totale de lignées cellulaires. Certaines cultures primaires sont possibles mais aucune lignée immortalisée n'a été généré. Le seul modèle de prolifération non-contrôlée est celui qui implique des cellules germinales ce qui aboutit à la rupture de la gonade et à la dissémination des gamètes dans l'organisme (Francis et al., 1995). En revanche, les voies de signalisation 71

impliquées dans des processus cancéreux tel que la voie de l'EGF sont présentes chez le ver et peuvent servir de modèle pour une étude moléculaire (Kirienko et al., 2010).

En termes de protocoles et comme décrit précédemment, les recombinaisons homologues sont difficilement utilisables chez le ver pour générer Knock Out ou Knock In. Récemment, une méthode a été développée pour permettre l'insertion d'un fragment d'ADN en un endroit précis mais il faut pour cela utiliser des animaux avant un transposon présent à proximité du site visé (Robert et al., 2006). Finalement, malgré l'essor important des études portant sur les interactions nématode-pathogène, de nombreuses limitations existent. La plus évidente concerne la température de culture des nématodes qui ne peut excéder 25 °C alors que les pathogènes de mammifères effectuent leurs cycles au sein d'un hôte dont la température est supérieure. Cette différence affecte tout le microbe, de son métabolisme général à son pouvoir pathogène. Ensuite se pose le problème de la spécificité de certains pathogènes qui réduit fortement le spectre d'hôtes envisageables. Finalement, certaines stratégies microbiennes visent à contrecarrer directement les systèmes de défenses adaptatifs de l'hôte. Etant donné que le nématode ne possède qu'un système immunitaire inné. le ver est inutilisable pour l'étude de ces processus. Néanmoins, il faut noter que de manière remarquable des facteurs de virulence relevant pour les mammifères produits par des bactéries telles que Yersinia pestis, Vibrio cholerae ou Salmonella typhimurium ont pu êtres étudiés ou identifiés à partir de travaux qui utilisent le nématode comme hôte (Styer et al., 2005, Vaitkevicius et al., 2006, Tenor et al., 2004).

Pour conclure, C. elegans est devenu un modèle incontournable en biologie et a une place de choix dans le cadre du réseau français EFOR (réseau d'Etudes Fonctionnelles chez les ORganismes modèles) (http://www. efor.fr/). De plus, il est important de rappeler qu'actuellement, une partie de la recherche en biologie ne peut se justifier qu'au travers de son impact à moyen ou long terme sur la société humaine. Dans ce contexte et même si le nématode tire son épingle du jeu grâce à de nombreuses similitudes avec l'homme, cet invertébré n'est qu'un complément voir une alternative aux mammifères mais en aucun cas un modèle de remplacement. Par contre, d'un point de vue fondamental, il faut garder à l'esprit que les atouts de cet animal lui ont permis de faire partie des métazoaires les mieux décrit et les mieux compris et ceci en moins de 50 ans, ce qui en soi est extrêmement enrichissant pour la biologie en général.

#### **Bibliographie**

ANDERSON, K. V., BOKLA, L. & NUSSLEIN-VOLHARD, C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*, 42, 791-8.

BARGMANN, C. I. 1993. Genetic and cellular analysis of behavior in *C. elegans. Annu Rev Neurosci*, 16, 47-71.

BARRIÈRE, A. & FELIX, M. A. 2006. Isolation of *C. elegans* and related nematodes. *In:* COMMUNITY", T. C. E. R. (ed.) *Worm-Book.* 

BARRON, G. L. 1976. Nematophagous fungi: three new species of *Myzocytium*. *Can J Microbiol*, 22, 752-62.

BARTEL, D. P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136, 215-33.

BREGER, J., FUCHS, B. B., APERIS, G., MOY, T. I., AUSUBEL, F. M. & MYLONAKIS, E. 2007. Antifungal Chemical Compounds Identified Using a *C. elegans* Pathogenicity Assay. *PLoS Pathog*, 3, e18.

BRENNER, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans. Genetics*, 77, 71-94. CARTY, M., GOODBODY, R., SCHRODER, M., STACK, J., MOYNAGH, P. N. & BOWIE, A. G. 2006. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol*, 7, 1074-81.

CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W. W. & PRASHER, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263, 802-5.

CHOE, K. P. & STRANGE, K. 2008. Genomewide RNAi screen and in vivo protein aggregation reporters identify degradation of damaged proteins as an essential hypertonic stress response. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295, C1488-98.

COLES, G. C., DICKLOW, M. B. & ZUCKER-MAN, B. M. 1989. Protein changes associated with the infection of the nematode *Caenorhabditis elegans* by the nematophagous fungus *Drechmeria coniospora*. *Int J Parasitol*, 19, 733-6.

COUILLAULT, C. & EWBANK, J. J. 2002. Diverse Bacteria Are Pathogens of *Caenorhabditis elegans*. *Infect Immun*, 70, 4705-7.

COUILLAULT, C., PUJOL, N., REBOUL, J., SABATIER, L., GUICHOU, J. F., KOHARA, Y. & EWBANK, J. J. 2004. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat Immunol.* 5, 488-494.

CRICK, F. H., BARNETT, L., BRENNER, S. & WATTS-TOBIN, R. J. 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192, 1227-32.

DOUGHERTY, E. C. & CALHOUN, H. G. 1948. Possible significance of free-living nematodes in genetic research. *Nature*, 161, 29. DRISCOLL, M. & GERSTBREIN, B. 2003. Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration. *Nat Rev Genet*, 4, 181-94.

DUPUY, D., BERTIN, N., HIDALGO, C. A., VEN-KATESAN, K., TU, D., LEE, D., ROSENBERG, J., SVRZIKAPA, N., BLANC, A., CARNEC, A., CARVUNIS, A. R., PULAK, R., SHINGLES, J., REECE-HOYES, J., HUNT-NEWBURY, R., VI-VEIROS, R., MOHLER, W. A., TASAN, M., ROTH, F. P., LE PEUCH, C., HOPE, I. A., JOHNSEN, R., MOERMAN, D. G., BARABASI, A. L., BAILLIE, D. & VIDAL, M. 2007. Genome-scale analysis of *in vivo* spatiotemporal promoter activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Biotechnol*, 25, 663-8.

DUVERGER, Y., BELOUGNE, J., SCAGLIONE, S., BRANDLI, D., BECLIN, C. & EWBANK, J. J. 2007. A semi-automated high-throughput approach to the generation of transposon insertion mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans. Nucleic Acids Res*, 35, e11.

ECKER, J. R. & DAVIS, R. W. 1986. Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 5372-6.

ELLIS, H. M. & HORVITZ, H. R. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans. Cell*, 44, 817-29.

FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KO-STAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caeno*rhabditis elegans. Nature, 391, 806-11.

FRANCIS, R., BARTON, M. K., KIMBLE, J. & SCHEDL, T. 1995. gld-1, a tumor suppressor gene required for oocyte development in *Caenorhabditis elegans. Genetics*, 139, 579-606.

FRASER, A. G., KAMATH, R. S., ZIPPERLEN, P., MARTINEZ-CAMPOS, M., SOHRMANN, M. & AHRINGER, J. 2000. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, 408, 325-30.

FREEDMAN, J. H., SLICE, L. W., DIXON, D., FIRE, A. & RUBIN, C. S. 1993. The novel metallothionein genes of *Caenorhabditis elegans*. Structural organization and inducible, cell-specific expression. *J Biol Chem*, 268, 2554-64.

GAN, Y. H., CHUA, K. L., CHUA, H. H., LIU, B., HII, C. S., CHONG, H. L. & TAN, P. 2002. Characterization of *Burkholderia pseudomallei* infection and identification of novel virulence factors using a *Caenorhabditis elegans* host system. *Mol. Microbiol.*, 44, 1185-97.

GIORDANO-SANTINI, R., MILSTEIN, S., SVRZIKAPA, N., TU, D., JOHNSEN, R., BAILLIE, D., VIDAL, M. & DUPUY, D. 2010. An antibiotic selection marker for nematode transgenesis. *Nat Methods*, 7, 721-3. IRAZOQUI, J. E., URBACH, J. M. & AUSUBEL, F. M. 2010. Evolution of host innate

BEL, F. M. 2010. Evolution of host innate defence: insights from Caenorhabditis elegans and primitive invertebrates. *Nat Rev Immunol*, 10, 47-58.

KAMATH, R. S. & AHRINGER, J. 2003. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhab-ditis elegans*. *Methods*, 30, 313-21.

KENYON, C. J. 2010. The genetics of ageing. *Nature*, 464, 504-12.

KIM, D. H., FEINBAUM, R., ALLOING, G., EMERSON, F. E., GARSIN, D. A., INOUE, H., TANAKA-HINO, M., HISAMOTO, N., MATSUMOTO, K., TAN, M. W. & AUSUBEL, F. M. 2002. A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science*, 297, 623-6.

KIRIENKO, N. V., MANI, K. & FAY, D. S. 2010. Cancer models in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Dyn*, 239, 1413-48.

KURZ, C. L., CHAUVET, S., ANDRES, E., AUROUZE, M., VALLET, I., MICHEL, G. P., UH, M., CELLI, J., FILLOUX, A., DE BENTZ-MANN, S., STEINMETZ, I., HOFFMANN, J. A., FINLAY, B. B., GORVEL, J. P., FERRANDON, D. & EWBANK, J. J. 2003. Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by *in vivo* screening. *EMBO* J., 22, 1451-1460.

KURZ, C. L. & EWBANK, J. J. 2003. *Caenorhabditis elegans*: an emerging genetic model for the study of innate immunity. *Nat. Rev. Genet.*, 4, 380-390.

LAMITINA, T., HUANG, C. G. & STRANGE, K. 2006. Genome-wide RNAi screening iden-

tifies protein damage as a regulator of osmoprotective gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 12173-8.

LEE, K. Z., KNIAZEVA, M., HAN, M., PUJOL, N. & EWBANK, J. J. 2010. The fatty acid synthase *fasn-1* acts upstream of WNK and Ste20/GCK-VI kinases to modulate antimicrobial peptide expression in *C. elegans* epidermis. *Virulence*, 1, 113 - 122.

LEE, R. C., FEINBAUM, R. L. & AMBROS, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-54.

LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J. M. & HOFFMANN, J. A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86, 973-83.

MAHAJAN-MIKLOS, S., TAN, M. W., RAHME, L. G. & AUSUBEL, F. M. 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell*, 96, 47-56.

MALLO, G. V., KURZ, C. L., COUILLAULT, C., PUJOL, N., GRANJEAUD, S., KOHARA, Y. & EWBANK, J. J. 2002. Inducible antibacterial defense system in *C. elegans. Curr Biol*, 12, 1209-14.

MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P. & JANEWAY, C. A., JR. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity [see comments]. *Nature*, 388, 394-7.

MELLO, C. C., KRAMER, J. M., STINCH-COMB, D. & AMBROS, V. 1991. Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *Embo* J, 10, 3959-70.

MOY, T. I., BALL, A. R., ANKLESARIA, Z., CA-SADEI, G., LEWIS, K. & AUSUBEL, F. M. 2006. Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 10414-9.

NIGON, V. & DOUGHERTY, E. C. 1949. Reproductive patterns and attempts at reciprocal crossing of *Rhabditis elegans* Maupas, 1900, and *Rhabditis briggsae* Dougherty and Nigon, 1949 (Nematoda: Rhabditidae). *J Exp Zool*, 112, 485-503.

## **ARTICLES**

PALM, N. W. & MEDZHITOV, R. 2009. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev*, 227, 221-33.

PASQUINELLI, A. E., REINHART, B. J., SLACK, F., MARTINDALE, M. Q., KURODA, M. I., MALLER, B., HAYWARD, D. C., BALL, E. E., DEGNAN, B., MULLER, P., SPRING, J., SRINIVASAN, A., FISHMAN, M., FINNERTY, J., CORBO, J., LEVINE, M., LEAHY, P., DAVIDSON, E. & RUVKUN, G. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408, 86-9.

PUJOL, N., CYPOWYJ, S., ZIEGLER, K., MILLET, A., ASTRAIN, A., GONCHAROV, A., JIN, Y., CHISHOLM, A. D. & EWBANK, J. J. 2008a. Distinct innate immune responses to infection and wounding in the C. elegans epidermis. *Curr Biol*, 18, 481-9.

PUJOL, N., LINK, E. M., LIU, L. X., KURZ, C. L., ALLOING, G., TAN, M. W., RAY, K. P., SO-LARI, R., JOHNSON, C. D. & EWBANK, J. J. 2001. A reverse genetic analysis of components of the Toll signalling pathway in *Caenorhabditis elegans. Curr. Biol.*, 11, 809-21.

PUJOL, N., ZUGASTI, O., WONG, D., COUILLAULT, C., KURZ, C. L., SCHULENBURG, H. & EWBANK, J. J. 2008b. Anti-fungal innate immunity in *C. elegans* is enhanced by evolutionary diversification of antimicrobial peptides. *PLoS Pathog*, 4, e1000105.

RAHME, L. G., STEVENS, E. J., WOLFORT, S. F., SHAO, J., TOMPKINS, R. G. & AUSUBEL, F. M. 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, 268, 1899-902.

RIDDLE, D. L., BLUMENTHAL, T., MEYER, B. J. & PRIESS, J. R. (eds.) 1997. *C. elegans II*, Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

ROBERT, V. & BESSEREAU, J. L. 2007. Targeted engineering of the *Caenorhabditis elegans* genome following Mos1-triggered chromosomal breaks. *Embo* J, 26, 170-83.

ROBERT, V., JORGENSEN, E. & BESSEREAU, J. L. 2006. MosTIC: A Novel Tool to Engineer the *C. elegans* Genome by Homologous Recombination. *European Worm Meeting*.

ROCHELEAU, C. E., DOWNS, W. D., LIN, R., WITTMANN, C., BEI, Y., CHA, Y. H., ALI, M., PRIESS, J. R. & MELLO, C. C. 1997. Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell*, 90, 707-16.

SARIN, S., PRABHU, S., O'MEARA, M. M., PE'ER, I. & HOBERT, O. 2008. *Caenorhabditis elegans* mutant allele identification by whole-genome sequencing. *Nat Methods*, 5, 865-7.

SEMPLE, J. I., GARCIA-VERDUGO, R. & LEHNER, B. 2010. Rapid selection of transgenic *C. elegans* using antibiotic resistance. *Nat Methods*, 7, 725-7.

SHEN, X., ELLIS, R. E., LEE, K., LIU, C. Y., YANG, K., SOLOMON, A., YOSHIDA, H., MORIMOTO, R., KURNIT, D. M., MORI, K. & KAUFMAN, R. J. 2001. Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell*, 107, 893-903.

SIFRI, C. D., BEGUN, J. & AUSUBEL, F. M. 2005. The worm has turned--microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Microbiol*, 13, 119-27.

STYER, K. L., HOPKINS, G. W., BARTRA, S. S., PLANO, G. V., FROTHINGHAM, R. & ABALLAY, A. 2005. *Yersinia pestis* kills *Caenorhabditis elegans* by a biofilm-independent process that involves novel virulence factors. *EMBO* Rep, 6, 992-7.

SULSTON, J. E., SCHIERENBERG, E., WHITE, J. G. & THOMSON, J. N. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 100, 64-119.

TABARA, H., SARKISSIAN, M., KELLY, W. G., FLEENOR, J., GRISHOK, A., TIMMONS, L., FIRE, A. & MELLO, C. C. 1999. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans. Cell*, 99, 123-32.

TENOR, J. L., MCCORMICK, B. A., AUSUBEL, F. M. & ABALLAY, A. 2004. Caenorhabditis elegans-based screen identifies Salmonella virulence factors required for conserved host-pathogen interactions. Curr Biol, 14, 1018-24.

THE *C. elegans* SEQUENCING CONSORTIUM 1998. Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology. *Science*, 282, 2012-8.

TIMMONS, L. & FIRE, A. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395, 854.

VAITKEVICIUS, K., LINDMARK, B., OU, G., SONG, T., TOMA, C., IWANAGA, M., ZHU, J., ANDERSSON, A., HAMMARSTROM, M. L., TUCK, S. & WAI, S. N. 2006. A *Vibrio cholerae* protease needed for killing of *Caenorhabditis elegans* has a role in protection from natural predator grazing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 9280-5.

VAN DEN BOOGERT, P. H., DIJKSTERHUIS, J., VELVIS, H. & VEENHUIS, M. 1992. Adhesive knob formation by conidia of the nematophagous fungus *Drechmeria coniospora*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 61, 221-9.

WHITE, J. G., SOUTHGATE, E., THOMSON, J. N. & BRENNER, S. 1986. The structure of the nervous system of the nematode *C. elegans. Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 314B, 1-340.

WONG, A., BOUTIS, P. & HEKIMI, S. 1995. Mutations in the clk-1 gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics*, 139, 1247-59.

WONG, D., BAZOPOULOU, D., PUJOL, N., TAVERNARAKIS, N. & EWBANK, J. J. 2007. Genome-wide investigation reveals pathogen-specific and shared signatures in the response of *Caenorhabditis elegans* to infection. *Genome Biol*, 8, R194.

YUAN, J., SHAHAM, S., LEDOUX, S., ELLIS, H. M. & HORVITZ, H. R. 1993. The C. elegans cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75, 641-52. ZIEGLER, K., KURZ, C. L., CYPOWYJ, S., COUILLAULT, C., POPHILLAT, M., PUJOL, N. & EWBANK, J. J. 2009. Antifungal innate immunity in *C. elegans*: PKCdelta links G protein signaling and a conserved p38 MAPK cascade. *Cell Host Microbe*, 5, 341-52.

ZUGASTI, O. & EWBANK, J. J. 2009. Neuroimmune regulation of antimicrobial peptide expression by a noncanonical TGF-beta signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* epidermis. *Nat Immunol*, 10, 249-256.

## En bref

## FORMATION ET COLLOQUE

L'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand organise du 1 au 4 février 2011 une formation à la chirurgie des rongeurs, agréée par le ministère de l'agriculture (R-63Univ-PASCAL-Chir-09).

Renseignements et inscriptions : Paul PRADIER Université Blaise Pascal UFR Sciences et Technologies Physiologie Animale - Biologie B Les Cézeaux

24 avenue des Landais BP 80026 63171 AUBIERE Cedex. France Tél: 04 73 40 74 80

E-mail: Paul.PRADIER@univ-bpcler-mont.fr

## Formation des membres des comités d'éthique (GIRCOR)

Dans la continuité des sessions organisées depuis 2006, le programme de formation des membres des comités d'éthique mené par le GRICE (www.gircor.net) se poursuivra en 2011.

Les écoles vétérinaires accueilleront chacune une session à des dates restant à définir.

> 1er trimestre: ENV Alfort > 2ème trimestre: ENV Toulouse > 3ème trimestre: Oniris (Nantes) > 4ème trimestre: VetAgroSup (Lyon) Les informations pratiques (dates, contacts, coût) seront précisées ultérieurement via Anilab et Afstal news.

# Formation à la chirurgie des rongeurs

L'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand organise du 1 au

4 février 2011 une formation à la chirurgie des rongeurs.

Cette formation est agréée par le ministère de l'agriculture et est assurée par des personnels de l'Université Blaise Pascal, de l'Université d'Auvergne et de l'INRA de Clermont-Theix.

Pout tout renseignement concernant cette formation contacter : Mr Paul Pradier

Paul.PRADIER@univ-bpclermont.fr

# **ESLAV-LAVA-ComVet AFSTAL Meeting**

Du 26 au 28 septembre 2010, l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse a accueilli le 11ème congrès scientifique ESLAV (European Society of Laboratory Animal Veterinarians), organisé cette année conjointement avec la ComVet AFSTAL et LAVA (Laboratory Animals Veterinary Association) ayant comme titre, "Vets for Life!".

Environ 160 participants de 19 pays différents à travers le monde ont assisté à la réunion.

Pendant deux jours, ils ont pu suivre pas moins de 24 conférences sur des thèmes très variées, tels que la spécialisation vétérinaire en médecine des animaux de laboratoire, l'impact de la révision de la Directive européenne sur l'expérimentation animale et encore les nouvelles techniques et méthodes d'anesthésie et d'analgésie et la surveillance per-opératoire des animaux.

Le Congrès a permis aux participants de se rencontrer et de nouer des contacts entre collègues de l'industrie et de la recherche publique pendant les pauses, agrémentées d'une « Session Posters », avec 40 communications scientifiques et techniques affichées.

Ce fut un très beau succès grâce à l'engagement et à la rigueur des comités scientifiques et d'organisation, grâce au professionnalisme des intervenants et des participants et aux nombreux services rendus par l'Ecole Vétérinaire, à commencer par son accueil chaleureux au sein de la belle ville de Toulouse.

#### Réseau EFOR

Le prochain colloque du réseau EFOR se déroulera les 14 et 15 février à Paris : les thématiques abordées seront les modèles émergents, les modèles agronomiques et méthodologies RNAi et les OGM végétaux. Pour plus de renseignements : http://www.efor.fr

### **Fondation Guido Bernardini**

La fondation Guido Bernardini organise ses 2 prochains workshops à Milan intitulés:

- > "Cleansing and decontamination": best practice in washing, disinfection and sterilization in the laboratory animal facility" du 25 au 27 janvier 2011.
- > "The health monitoring of rodents and the cage level environment in IVC equipped facilities" les 15 et 16 mars 2011.

Contact secrétariat: <a href="mailto:secretary@fon-dazioneguidobernardini.it">secretary@fon-dazioneguidobernardini.it</a> ou <a href="mailto:http://www.fondazioneguidobernardini.org/en/home.aspx">http://www.fondazioneguidobernardini.org/en/home.aspx</a>.

## Symposium FELASA 2010, Helsinki, Finland

Ce congrès a été un succès avec la participation de 1200 personnes. Le symposium 2013 se déroulera à Barcelone en Espagne.

## ICLAS – LASA symposium

Le symposium est organisé par le Laboratory Animal Science Association- Turkey (LASA-Turkey) en collaboration avec l'International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) et se déroulera à Istanbul en Turquie du 13 au15 juin 2011.

Les thématiques abordées seront l'évaluation éthique, le protocole expérimental, les nouvelles technologies en expérimentation animale, les nouveaux modèles animaux, les méthodes de réduction. Pour plus d'information, vous pouvez visiter le site web suivant :

http://www.iclas2011istanbul.org/default.asp

## **Society Of Toxicology (SOT)**

Son congrès se déroulera du 6 au 10 mars 2011 à Washington.



Le Master Professionnel de Physiologie et **Neurosciences** 2ème année spécialité « Bioexpérimentation animale » de l'université de Lyon 1 (M2P BEA) accueille tous les ans une quinzaine d'étudiants. Cette formation, sous la responsabilité de Dr Anne Morales, vise à préparer les étudiants à des fonctions telles que directeur d'étude junior. responsable d'unité expérimentale ou d'élevage, ou encore assistant de recherche clinique dans le domaine vétérinaire. La possibilité est notamdonnée aux étudiants d'acquérir le Niveau 1 d'Expérimen-Biologique (accréditation tation Category C FELASA).

La formation repose également beaucoup sur le stage de longue durée effectué à partir du mois de Février (6 mois) ou dès la rentrée universitaire dans le cadre d'un contrat de professionnalisation en alternance. Si vous pensez pouvoir accueillir en stage dès Février 2011 un étudiant, vous pouvez contacter C. Berthier: <a href="mailto:christine.berthier@univ-lyon1.fr">christine.berthier@univ-lyon1.fr</a>

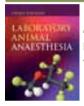
Plus d'informations sur le master sont disponibles à l'adresse suivante : http://bioexperimentation.univlyon1.fr/

## Site web "Procedure with care"

Ce site web a été réalisé pour former et informer les chercheurs et techniciens aux administrations chez le rat et la souris. Vous pouvez visualiser les vidéos sur le site suivant :

http://www.procedureswithcare.org.uk/

## PARUTION D'OUVRAGE



Anesthésie des animaux de laboratoire, troisième édition

AUTEUR: Paul Flecknell,

Academic Press | 2009 | ISBN: 0123693764 | 304 pages |

Les ajouts et les modifications apportées à cette nouvelle édition reflètent l'évolution de la pratique de l'anesthésie et les changements dans nos attitudes à l'égard du bien-être des animaux de laboratoire.

Cette édition fournit des informations nouvelles sur l'anesthésie et l'analgésie, et une bibliographie entièrement revue et mise à jour.

## Instructions aux auteurs

- 1) Les manuscrits devront être écrits en français ; seuls les résumés peuvent être en anglais.
- 2) Les manuscrits seront envoyés sous format word à stal@afstal.com. en double interligne et toutes les pages seront numérotées.

## 3) Organisation du manuscrit

- a) La première page comportera le titre de l'article en français, le prénom suivi du nom de(s) l'Auteur(s), le(s) nom(s) et l'adresse ou les adresses du (des) laboratoire(s) ou établissement(s) où a été effectué le travail (chaque adresse sera numérotée et les numéros correspondants seront reportés en exposant sur le nom des auteurs) ainsi qu'une adresse électronique de correspondance avec l'auteur principal : la liste des abréviations employées et leur signification, et si nécessaire, la dénomination, la date et le lieu de la réunion scientifique où a été présentée la communication.
- b) La seconde page comportera un bref résumé (10 à 15 lignes) suivi de 3 à 5 mots-clés, en français et en anglais.

A l'exception des revues générales, le manuscrit devra contenir les sections suivantes:

- c) Introduction : elle devra poser le problème de façon claire et concise.
- d) Matériels et méthodes : cette section comprendra successivement l'identification des animaux de laboratoire en respectant les règles internationales (race, souche, etc.) et en utilisant pour les espèces les moins courantes, le nom français suivi de la

dénomination zoologique Linnéenne (exemple : le poisson combattant "Betta splendens"), l'appareillage lorsqu'il est particulier, le protocole, les méthodes particulières de dosage, les méthodes statistiques et les produits utilisés (en utilisant le nom générique, et si le produit est dans le commerce, le nom du fabricant ou du fournisseur, la ville et le pays). La forme du produit, base ou sel devra être précisée.

- e) Résultats: l'utilisation des figures et des tableaux est encouragée, en évitant les redondances. L'utilisation des tests statistiques devra permettre l'évaluation et l'interprétation des résultats.
- f) **Discussion**: Elle devra s'appuyer essentiellement sur les résultats présentés et faire référence aux résultats de même nature déià publiés.
  - q) Conclusion
  - h) Bibliographie

## 4) Tableaux et figures

- a) Chaque tableau sera présenté sous format word, en annexe, à la suite du document texte. Chaque tableau sera numéroté (en chiffres romains) tel que cité dans le texte. Dans le tableau, les renvois seront référencés par les lettres a, b, c, etc. et leur signification devra apparaître sous le tableau. Chaque tableau sera accompagné, sur une page séparée, d'une légende qui explicitera brièvement son contenu et les abréviations utilisées. La légende apparaîtra lors de la publication en haut du tableau.
- b) Chaque figure devra être présentée en annexe et sera numérotée (en chiffres arabes) tel que mentionné

dans le texte. Le haut de la figure sera mentionné clairement. La clarté du dessin et l'épaisseur des traits et des lettres devront être suffisamment marquées pour permettre une réduction au 1/3. La légende de la figure apparaîtra sur une page séparée et explicitera brièvement le contenu de la figure, et si nécessaire, l'essentiel des résultats et les abréviations utilisées. Les photos et images devront être envoyées en format TIFF, à une résolution minimum de 600 dpi.

## 5) Références

a) Dans le texte, les références à des travaux publiés devront être citées suivant le système d'Harvard (noms et date). S'il y a plus de 2 Auteurs dans une même référence, la citation dans le texte devra comprendre le nom du premier Auteur suivi par "et al.". Les références citées simultanément devront être classées chronologiquement.

Exemple: (Langer 1981; Chamoveet Anderson 1989 ; Gérard et al. 1990).

Les citations se référant à des communications personnelles ou à des observations non publiées devront être strictement limitées et apparaître dans le texte entre parenthèses, mais non dans la liste des références.

b) La Bibliographie sera présentée sur une (des) feuille(s) séparée(s). Les références seront classées par ordre alphabétique des Auteurs et pour chaque Auteur par ordre chronologique. Tous les Auteurs d'une même référence devront être mentionnés, 77

Plusieurs références d'un même Auteur, apparaissant une même année, devront être différenciées en ajoutant un suffixe (a, b, c, etc.) à l'année.

Chaque référence devra comprendre la séquence suivante : le nom de(s) l'Auteur(s), l'initiale de leur prénom, l'année de publication entre parenthèses, le titre complet de l'article, le titre du journal dans lequel l'article est paru (abrégé selon les normes), le volume de la revue et la pagination de l'article (première et dernière page).

Exemple : Zerial A, Lemaître M (1990) Recherche de médicaments anti-SIDA et évaluation de leur efficacité dans des modèles animaux. Sci Tech Anim Lab 15, 115-122.

Les références aux articles parus dans les livres devront comprendre la séquence suivante : le nom de(s) l'Auteur(s), l'initiale de son prénom, l'année de publication entre parenthèses, le titre complet de l'article, ln : suivi du titre complet du livre, le nom et l'initiale du prénom de(s) l'Auteur(s) du livre entre parenthèses, l'éditeur, la ville et la pagination de l'article (première et dernière page).

Exemple: Chamove A, Anderson J (1989) Examining environmental enrichment. In: Housing, care and psychological wellbeing of captive and laboratory primates (Segal E, ed), Noyes publications, Park Ridge, 183-202.

Un article ne pourra être cité "sous presse" que s'il a été accepté pour publication et si le nom du journal est donné.

### 6) Remise des manuscrits

Le manuscrit et les tableaux, au for-

mat électronique .doc, ainsi que les images et photos au format .TIFF seront transmis à l'adresse stal@afstal.com. Les logiciels compatibles chez l'imprimeur sont : QuarkXpress (texte), Word 6 (texte, format PC ou Mac), Illustrator 6 (images), Photoshop (dessins).

L'auteur principal devra mentionner son numéro de téléphone et son adresse. Les Auteurs s'engagent à ne pas proposer leur manuscrit à une autre revue avant d'avoir reçu la décision du Comité de Rédaction. Le Comité de Rédaction soumettra le manuscrit à l'approbation du Comité de Lecture.

## 7) Corrections des épreuves

Les Auteurs devront retourner les épreuves corrigées dans un délai de 5 jours à l'adresse électronique stal@afstal.com.



# Association Française des Sciences et Techniques de l'Animal de Laboratoire

## **ADHESION - ABONNEMENT 2011**

Je soussigné(e),		
Nom et prénomFonction		
Domaine d'activité		
Société et adresse complète		
E-mail:Tel:	Fax :	
demande mon adhésion à l'AFSTAL.		
Parrains: 1. M (membres de l'AFSTAL) 2. M	Signature des parrains :	
Date : Date d'entérinement au Conseil d'Administration :	Signature du demandeur :	
FRANCE et BCLA	S 2011	
		+ Abonnement Laboratory Animals
Adhésion AFSTAL	50 €	90 €
Adhésion AFSTAL + Abonnement STAL	70 €	110 €
Adhésion AFSTAL + Abonnement STAL (½ tarif : Etudia	ant, retraité, chômeur) 35 €	75 €
Abonnement STAL (sans adhésion AFSTAL)	80 €	
ETRANGER /20	011	
		+ Abonnement Laboratory Animals
Adhésion AFSTAL	65 €	105 €
Adhésion AFSTAL + Abonnement STAL	85 €	125 €
Abonnement STAL (sans adhésion AFSTAL)	92 €	
Total : Adresse où vous souhaitez recevoir la revue		••••••
Joindre votre règlement libellé (agrafez SVP votre CHEQUE à la DI de l'AFSTAL et retourner à : Sébastien Paturance, Trésorier de l'AFS	STAL, 28 rue Saint-Dominique, 75007 l	
Règlement par BON DE COMMANDE : Prière de joindre à votre demande d'adhésion à l'AFSTAL, le bon de commo		e votre adhésion

AFSTAL 28 rue Saint-Dominique 75007 PARIS courriel : afstal@free.fr - Web: http://www.afstal.com Association Déclarée : J.O. du 14 Avril 1972 ; N°SIRET 43120536800019

soit validée, le numéro d'engagement présent sur ce bon de commande devra être rappelé lors du paiement par votre service comptable.

# Statuts de l'Association Française des Sciences et Techniques de l'Animal de Laboratoire (A.F.S.T.A.L.)

## ARTICLE PREMIER

Il est fondé entre les adhérents aux présents statuts une Association à but non lucratif et à caractère purement scientifique, régie par la loi du ler juillet 1901 et le décret du 16 août 1901, ayant pour titre "Association Française des Sciences et Techniques de l'Animal de Laboratoire" (A.F.S.T.A.L.).

#### **ARTICLE 2**

Cette association a pour buts :

- > d'une manière générale, de rationaliser et d'améliorer l'usage des animaux de laboratoire au service de la santé de l'homme et de l'animal; > en particulier, de codifier l'éthique de leur utilisation et d'en faire mieux connaître les principes;
- > d'encourager la recherche et de promouvoir les connaissances concernant la biologie et la pathologie des animaux de laboratoire;
- > de mettre en oeuvre les moyens destinés à permettre de limiter quantitativement leur emploi ;
- > de développer les relations interdisciplinaires centrées sur l'animal de laboratoire ;
- > d'échanger régulièrement au moyen de colloques, de groupes de travail et de communication toutes les informations scientifiques et techniques relatives aux animaux de laboratoire ;
- > d'entreprendre toutes les activités scientifiques qui s'y rapportent ;
- > d'entreprendre le cas échéant toute action jugée utile à la défense des expérimentateurs respectant les règles d'éthique et la réglementation en vigueur.

#### **ARTICLE 3**

Le siège social est situé à l'adresse suivante :

28 rue Saint Dominique 75007 PARIS

Tél et télécopie : 01 45 56 91 16

Le siège social pourra être transféré en cas de nécessité par simple décision du Conseil d'Administration, en tout autre lieu, dans les limites du territoire français, mais cette mesure devra être entérinée lors de la prochaine Assemblée Générale Statutaire Annuelle.

## **ARTICLE 4**

L'association se compose de membres fondateurs, de membres bienfaiteurs, de membres adhérents et de membres d'honneur.

#### **ARTICLE 5**

Pour devenir membre, il faut être présenté par deux membres de l'Association et agréé par son Conseil d'Administration.

Le Conseil d'Administration propose à l'approbation de l'Assemblée Générale Annuelle Statutaire le montant des cotisations des différentes catégories de membres pour la prochaine année civile.

Le titre de membre d'honneur peut être décerné par le Conseil d'Administration aux personnes qui rendent ou ont rendu des services signalés à l'Association. Ce titre confère à ceux qui l'ont obtenu, le droit de faire partie de l'Assemblée Générale sans être tenus de payer une cotisation annuelle.

Sur la proposition de son Conseil d'Administration, l'Assemblée Générale pourra décerner le titre de Président d'Honneur à un ou plusieurs des anciens présidents de l'Association; la possession de ce titre exempte celui qui en est investi, du paiement de toute cotisation.

## **ARTICLE 6**

La qualité de membre de l'Association se perd :

- 1° Par démission :
- 2° Par radiation prononcée par le Conseil d'Administration pour nonpaiement de la cotisation ;
- 3° Par radiation prononcée par l'Assemblée Générale pour motif grave sur proposition du Conseil d'Administration

## **ARTICLE 7**

Les ressources de l'Association sont constituées par le montant des cotisations de ses membres et des éventuelles subventions de l'État, des Collectivités publiques ou des organismes privés et des éventuels dons et legs.

### **ARTICLE 8**

L'Association est administrée par un Conseil composé d'au moins douze membres élus au scrutin secret pour trois ans par l'Assemblée Générale, choisis et renouvelables par tiers tous les ans, parmi les membres dont se compose cette Association. Ces membres sortants ne sont pas immédiatement rééligibles plus d'une fois. En cas de vacance, le Conseil d'Administration pourvoit provisoirement

au remplacement de ses membres. Il est procédé à leur remplacement définitif par la plus prochaine Assemblée Générale. Le mandat des membres ainsi élus prend fin à l'échéance normale du mandat des membres remplacés.

Chaque année le Conseil d'Administration élit, au scrutin secret, un bureau constitué d'un Président, d'un Vice-Président ou deux, d'un Secrétaire Général et d'un Trésorier. Le Président n'est immédiatement rééligible que deux fois.

#### **ARTICLE 9**

Le Conseil d'Administration se réunit au moins une fois par an, sur convocation, soit du Président, soit à son défaut, du Secrétaire Général et aussi souvent que l'intérêt de l'Association l'exige ; sa convocation est de droit lorsque le tiers de ses membres le demande.

La présence physique d'au moins sept membres du Conseil d'Administration est nécessaire pour la validité des délibérations.

Tout membre du Conseil, qui, sans excuse, n'aura pas assisté à deux réunions consécutives, sera considéré comme démissionnaire.

Le Conseil d'Administration peut inviter à siéger avec lui, de façon temporaire, toute (s) personne (s) qu'il juge utile (Animateurs de groupes d'études, Conseillers, Experts, Représentants d'autres Sociétés Association, etc....). Ces personnes participent aux discussions mais ne prennent pas part aux votes du Conseil d'Administration.

## **ARTICLE 10**

Les membres de l'Association ne peuvent recevoir aucune rétribution eu égard aux fonctions qui leur sont confiées.

Les personnes rétribuées par l'Association peuvent être invitées à assister avec voix consultative, aux séances de l'Assemblée Générale et du Conseil d'Administration

## **ARTICLE 11**

L'Assemblée Générale de l'Association comprend tous les membres composant celle-ci. Chacun des membres de l'Association ne peut être représenté à l'Assemblée Générale que par un délégué.

L'Assemblée Générale se réunit au moins une fois par an et chaque fois qu'elle est convoquée par le Conseil d'Administration, ou selon les modalités définies à l'article 13.

Le Conseil d'Administration se constitue en bureau et fixe l'ordre du jour. L'Assemblée Générale entend les rapports sur la gestion du Conseil d'Administration ainsi que sur la situation financière et morale de l'Association. Elle approuve les comptes de l'exercice clos, délibère sur les questions mises à l'ordre ou jour et pourvoit, s'il y a lieu, au renouvellement des membres du Conseil d'Administration.

Le vote par correspondance ou procuration est admis.

Chaque Sociétaire présent à l'Assemblée Générale ne pourra pas disposer de plus de trois pouvoirs. Le rapport annuel et les comptes seront tenus à la disposition des membres de l'Association, au siège social, pendant le mois qui précède l'Assemblée Générale annuelle.

## **ARTICLE 12**

Les dépenses sont ordonnancées par le Président. Les comptes ouverts au nom de l'Association fonctionnent sous la signature du Président ou du Trésorier. L'Association est représentée en justice et dans tous les actes de la vie civile par le Président ou par tout autre membre du Conseil d'Administration choisi à cet effet par celui-ci. Le représentant de l'Association doit jouir du plein exercice de ses droits civils.

De même l'Association pourra être représentée auprès des autres Associations par un de ses membres.

Les membres de l'Association ne peuvent recevoir aucune rétribution eu égard aux fonctions qui leur sont confiées.

Les personnes rétribuées par l'Association peuvent être invitées à assister avec voix consultative, aux séances de l'Assemblée Générale et du Conseil d'Administration.

### **ARTICLE 13**

Si besoin est, ou sur la demande de la moitié plus un des membres inscrits, le Président convoque une Assemblée Générale extraordinaire pour l'étude du sujet ayant motivé la convocation.

## **ARTICLE 14**

Les statuts ne peuvent être modifiés que sur la proposition du Conseil d'Administration ou du dixième des membres dont se compose l'Assemblée Générale, soumise au Bureau au moins un mois avant la séance.

L'Assemblée doit se composer du quart, au moins, des membres en exercice. Si cette proportion n'est pas atteinte, l'assemblée est convoquée de nouveau, mais à quinze jours au moins d'intervalle, et cette fois, elle peut valablement délibérer, quel que soit le nombre de membres présents. 81

Dans tous les cas, les statuts ne peuvent être modifiés qu'à la majorité des deux tiers des membres présents.

## **ARTICLE 15**

L'Assemblée Générale appelée à se prononcer sur la dissolution de l'Association et convoquée spécialement à cet effet, doit comprendre, au moins, la moitié plus un des membres en exercice. Si cette proportion n'est pas atteinte, l'Assemblée est convoquée à nouveau, mais à quinze jours au moins d'intervalle, et, cette fois, elle peut valablement délibérer, quel que soit le nombre des membres présents. Dans tous les cas, la dissolution ne peut être votée qu'à la majorité des deux tiers des membres présents.

### **ARTICLE 16**

En cas de dissolution, l'Assemblée Générale désigne un ou plusieurs commissaires, chargés de la liquidation des biens de l'Association. Elle attribue l'actif net à un ou plusieurs établissements analogues, publics ou reconnus d'utilité publique.







# **2011 TRAINING COURSES**

CLEANSING AND DECONTAMINATION: BEST PRACTICES IN WASHING, DISINFECTION AND STERILIZATION IN THE LABORATORY ANIMAL FACILITY	January 25-27, 2011
THE HEALTH MONITORING OF RODENTS AND THE CAGE LEVEL ENVIRONMENT IN IVC EQUIPPED FACILITIES	March 15-16, 2011
ORGANIZATION AND PROCEDURES IN THE MODERN LABORATORY ANIMAL FACILITY	May 16-20, 2011
THE MANAGEMENT OF GENETICALLY MODIFIED RODENT COLONIES	September 20-21, 2011
BIOCONTAINMENT IN THE LABORATORY ANIMAL FACILITY	November 8-9, 2011

# Vous voyez une souris. Nous voyons notre contribution à la lutte contre le cancer.



Cette souris est un élément essentiel de la recherche en oncologie. Conscient de l'enjeu de vos projets, Charles River mobilise toutes ses ressources pour proposer des modèles immunodéficients de la plus haute qualité sanitaire ainsi que les ressources techniques et scientifiques dont vous avez besoin pour accélérer vos projets.

Pourquoi est-ce important? Car nous savons que notre contribution peut avoir un impact direct sur le bon fonctionnement d'un processus essentiel – votre recherche.

Pour plus d'informations sur nos modèles de recherche, visitez www.criver.com.

Parce que votre recherche est essentielle.





**Humane Care** 





