

PLATEFORME DE BIOLOGIE IN VIVO

PROCÉDURE NORMALISÉE DE FONCTIONNEMENT (PNF)

TITRE :		NO PNF :	
LIGNES DIRECTRICES SUR L'IRRADIATION DE SOURIS		800-STA-03	
DATE D'ENTRÉE EN VIGUEUR :	RÉVISION :	DATE :	PAGE :
2018-05-05	2	2023-12-18	1 DE 7

APPROBATION

DIRECTRICE DES OPÉRATIONS : Manon Valiquette	SIGNATURE : 	DATE : 2023-12-18
CHEF DE SERVICE VÉTÉRINAIRE : Julie Gervais	SIGNATURE : 	DATE : 2023-12-18

PROCÉDURE NORMALISÉE DE FONCTIONNEMENT (PNF)			
TITRE : LIGNES DIRECTRICES SUR L'IRRADIATION DE SOURIS		NO PNF : 800-STA-03	
DATE D'ENTRÉE EN VIGUEUR : 2018-05-05	RÉVISION : 2	DATE : 2023-12-18	PAGE : 2 DE 6

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION

1.1 Objectif

1.2 Application

1.3 Responsabilités

1.4 Matériel et documentation

2. PROCÉDURES

3. RÉFÉRENCES

4. FORMULAIRE

1. INTRODUCTION

1.1 Objectif

Décrire les procédures favorisant l'obtention d'un modèle de souris myélosupprimées par irradiation sublétales dans un but de reconstitution du système immunitaire.

1.2 Application

Cette PNF n'est pas une directive de l'administration de la plateforme de biologie In Vivo (PBIV) mais est mise à la disposition de tous les employés et les usagers de l'animalerie.

1.3 Responsabilités

Les personnes responsables de l'irradiation de souris et de leur suivi de santé, doivent respecter en tous points le protocole expérimental tel qu'approuvé par le CDEA.

1.4 Matériel et documentation

1.4.1 Appareils/Instruments/Équipements

- Irradiateur
- Charte de dose d'irradiation par année
- Nourriture irradiée (2918 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet-Irradiated)
- Balance
- Solution désinfectante diluée
- Solution isotonique stérile pour injection (ex. 0.9% NaCl, solution de lactate de Ringer)
- Supplément alimentaire (ex. Nutra-Gel Diet™ de Bio-Serv, DietGel® de ClearH2O, Transgenic Dough Diet™ de Bio-Serv, Bacon Softies™ de Bio-Serv)

PROCÉDURE NORMALISÉE DE FONCTIONNEMENT (PNF)			
TITRE : LIGNES DIRECTRICES SUR L'IRRADIATION DE SOURIS		NO PNF : 800-STA-03	
DATE D'ENTRÉE EN VIGUEUR : 2018-05-05	RÉVISION : 2	DATE : 2023-12-18	PAGE : 3 DE 6

- Seringues
- Aiguilles
- Eau traitée par osmose inverse
- Cage d'irradiation et cage avec couvert filtrant propre et stérile

1.4.2 Documents

N/A

1.4.3 Formulaires spécifiques à cette PNF

N/A

1.4.4 Autres PNF reliées

800-EQU-20; Irradiateur

800-STA-01; Importation d'animaux et de matériel biologique

2. PROCÉDURES

2.1 Prévention de modification du modèle animal

2.1.1 Variation génétique. La dérive génétique survenant dans une lignée peut entraîner une différence dans la réponse à l'irradiation. Les colonies de souris maintenues à la PBIV pour utilisation sur protocoles d'irradiation devraient donc être maintenues de façon à prévenir la dérive génétique. Différentes lignées de souris peuvent également répondre différemment à une même dose d'irradiation. Une étude pilote peut être justifiée afin de valider une dose d'irradiation dans une nouvelle lignée. À noter également que des animaux de lignée identique provenant de différents fournisseurs peuvent comporter des différences génétiques notables et introduire des variations importantes dans leur réponse immunitaire et autres suite à une irradiation, tout comme le ferait une modification de l'âge, du poids, du sexe ou de la condition de santé de l'animal.

2.1.2 Réduction du stress

Il est nécessaire de réduire le plus possible le stress induit lors de la manipulation des animaux, stress qui pourrait influencer le phénotype post-irradiation. Les animaux irradiés devraient préalablement être bien acclimatés aux conditions d'hébergement. Des animaux nés dans les mêmes conditions d'hébergement que lors de l'utilisation, ou acclimatés pendant au moins une semaine (idéalement 2-3 semaines), sont recommandés pour des fins d'irradiation. **Lors de l'irradiation, les animaux provenant de différentes cages ne devraient pas être réunis à l'intérieur de la même cage d'irradiation.**

2.2 Utilisation de doses d'irradiation appropriées

2.2.1 Il est nécessaire de se référer à la charte d'irradiation disponible dans la pièce d'irradiation, afin de s'assurer d'administrer la dose myélosuppressive voulue. Une dose trop élevée peut engendrer d'avantage d'atteinte au niveau de la barrière intestinale et favoriser le développement de bactériémie et de toxémie. Il est possible de fractionner la dose totale en

PROCÉDURE NORMALISÉE DE FONCTIONNEMENT (PNF)			
TITRE : LIGNES DIRECTRICES SUR L'IRRADIATION DE SOURIS		NO PNF : 800-STA-03	
DATE D'ENTRÉE EN VIGUEUR : 2018-05-05	RÉVISION : 2	DATE : 2023-12-18	PAGE : 4 DE 6

2 doses égales administrées à au moins 3 heures d'intervalles afin de minimiser les dommages tissulaires nuisibles. Une dose trop faible peut être en cause lors de déficit de greffe.

2.3 Antibiothérapie prophylactique

Une antibiothérapie n'est généralement pas nécessaire suite à une irradiation avec reconstitution du système immunitaire et hébergement en cages stériles. Elle peut cependant aider à réduire la charge bactérienne intestinale et respiratoire et diminuer la morbidité. Toute antibiothérapie doit préalablement être discutée avec le vétérinaire et autorisée au protocole.

2.3 Traitements prophylactiques et suivi clinique

- 2.4.1 La période de 2 semaines suivant l'irradiation est une période critique pour la santé des animaux irradiés. Pendant cette période, le système immunitaire est grandement affaibli, vu la perte progressive des cellules immunitaires en circulation et sa reconstitution encore incomplète. De plus, la barrière intestinale est moins performante, augmentant alors le risque de translocation des habitants de la flore intestinale vers la circulation sanguine.
- 2.4.2 L'utilisation de souris de plus de 20g au moment de l'irradiation permet d'augmenter les chances de récupération. Éviter le plus possible de soumettre des souris de moins de 20g à une irradiation. À titre informatif, des souris C57BL/6 femelles atteignent 20g vers l'âge de 10 semaines, alors que les mâles C57BL/6 atteignent ce même poids à environ 5 semaines d'âge.
- 2.4.3 Suite à l'irradiation, les souris doivent être transférées dans de nouvelles cages stériles et observées au moins une fois par jour pendant les deux premières semaines. Transférer le nid lors du changement de cage afin de diminuer le stress relié à cette activité. Un matériel de nidification abondant (ex. Envirodry) et un abri aident à diminuer le stress et favorisent la thermorégulation.
- 2.4.4 Offrir un supplément alimentaire facile à mastiquer (voir section 1.4.1) dans un contenant (ex petit pétri stérile) disposé sur le plancher de la cage pendant au moins deux semaines suite à l'irradiation peut contribuer à faciliter la récupération des animaux. Offrir seulement une petite quantité et renouveler souvent cette nourriture (au moins deux fois par semaine), de façon à ce qu'elle demeure humide. Le Bacon Softies™ de Bio-Serv peut être renouvelé aux quelques jours, contrairement aux autres produits qui doivent souvent être renouvelés quotidiennement. Ce supplément est bénéfique puisque les animaux présentent souvent une diminution de la stabilité des dents suite à l'irradiation, en plus d'une diminution de l'appétit et une perte hydrique. Il est important de débiter les suppléments alimentaires avant tout signe de morbidité (i.e. idéalement 4 jours avant l'irradiation) puisque le comportement explorateur des souris est grandement diminué lors de stress ou morbidité.
- 2.4.5 Peser les animaux le jour de l'irradiation et au moins deux fois par semaine pendant au moins les 2 semaines suivant l'irradiation. S'assurer que la perte de poids ne dépasse pas les points

PROCÉDURE NORMALISÉE DE FONCTIONNEMENT (PNF)			
TITRE : LIGNES DIRECTRICES SUR L'IRRADIATION DE SOURIS		NO PNF : 800-STA-03	
DATE D'ENTRÉE EN VIGUEUR : 2018-05-05	RÉVISION : 2	DATE : 2023-12-18	PAGE : 5 DE 6

limites (%) préétablis au protocole approuvé par le CDEA, habituellement 20% du poids initial. La perte de poids doit être calculée (%) après chaque pesée en comparant avec le poids pré-irradiation. **Ces données doivent demeurer disponibles dans la salle d'hébergement.** Vers la fin de la deuxième semaine, la majorité des animaux devraient reprendre le poids perdu. À ce moment, si certains animaux perdent toujours du poids, leur pronostic devrait être considéré comme pauvre, et ces derniers devraient faire l'objet d'une considération d'euthanasie.

2.4.6 Évaluer l'état d'hydratation par la méthode du pli cutané au moins deux fois par semaine pendant au moins les 2 semaines suivant l'irradiation (idéalement quotidiennement). En cas de déshydratation (quel que soit le degré), administrer 0,8 ml de solution isotonique stérile (ex. saline stérile 0.9%) préférablement chauffé à la température du corps, SC, SID, au besoin, et poursuivre l'évaluation de l'état d'hydratation quotidiennement.

2.4.6.1 Pour évaluer l'état d'hydratation par la méthode du pli cutané, il suffit de prendre la peau de la région thoracique dorsale entre l'index et le pouce, de soulever le pli cutané et d'observer la rapidité avec laquelle la peau retourne à sa position initiale. Si le retour est instantané, l'animal ne présente pas de déshydratation perceptible. Une persistance du pli cutané de plus de 2 secondes indique une déshydratation sévère et s'accompagne souvent d'autres signes cliniques (yeux renfoncés causant la fermeture partielle des paupières, diminution de l'activité, poil ébouriffé etc.). Le pronostic associé à une déshydratation sévère est pauvre, et en cas d'absence d'amélioration suite à une première réhydratation, l'euthanasie devrait être considérée. Notez qu'une déshydratation de 5% ou moins n'est pas détectable par la méthode du pli cutané. Ceci signifie qu'à la moindre diminution de l'élasticité de la peau, l'animal doit être considéré déshydraté de façon significative.

2.5 Reconstitution du système immunitaire

2.5.1 La transplantation de cellules souches hématopoïétique devrait toujours être accomplie à l'intérieur d'un même intervalle de temps post-irradiation. Il est recommandé de procéder à la transplantation entre 2 et 10 heures suite à l'irradiation, mais jamais plus de 24 heures plus tard.

2.5.2 Les cellules souches hématopoïétiques sont idéalement administrées via la veine caudale, en utilisant une aiguille de calibre 26 ou 27 G.

2.5.3 Tout animal irradié avec des doses létales et n'ayant pas reçu de transplantation de cellules souches hématopoïétique (contrairement à ce qui était prévu) doit être euthanasié en dedans de 48 heures après l'irradiation.

2.6 Traitement et évaluation des cellules utilisées pour la transplantation

2.6.1 Les cellules doivent être filtrées afin d'en retirer les amas de cellules et d'éviter les embolies pulmonaires. Un filtre de 30 à 40 µm doit être utilisé.

2.6.2 Tout matériel biologique murin importé dans le but d'une utilisation à la PBIV doit démontrer un profil négatif pour au minimum les agents pathogènes les plus prévalent. Voir PNF 800-STA-01.

PROCÉDURE NORMALISÉE DE FONCTIONNEMENT (PNF)			
TITRE : LIGNES DIRECTRICES SUR L'IRRADIATION DE SOURIS		NO PNF : 800-STA-03	
DATE D'ENTRÉE EN VIGUEUR : 2018-05-05	RÉVISION : 2	DATE : 2023-12-18	PAGE : 6 DE 6

Cependant, il n'est pas nécessaire d'effectuer des tests sur le matériel biologique murin prélevé d'animaux hébergés dans le secteur SPF de l'animalerie. Des techniques de manipulations stériles et des équipements dédiés sont cependant requis pour éviter que les cellules se contaminent avant d'être transplantées.

3 Causes possibles de défaut de reconstitution du greffon

- 3.1 Voie d'administration de la greffe de cellules hématopoiétiques. L'administration directement dans la circulation sanguine augmente les chances d'établissement dans la moelle osseuse.
- 3.2 Absence de reconstitution des cellules hématopoiétiques dues à des erreurs techniques. La présence d'un nombre insuffisant de cellules dans l'inoculum, une déficience acquise ou héréditaire des cellules de l'inoculum, ou un défaut de survie des cellules de l'inoculum.

3. RÉFÉRENCES

1. Principles of Bone Marrow Transplantation (BMT): Providing Optimal Veterinary and Husbandry Care to Irradiated Mice in BMT Studies. Raimon Duran-Struuck and Robert C Dysko, JAALAS, 2009

4. FORMULAIRE

N/A