

Mise au point d'un système de pesée pour rongeurs élevés en isolateur stérile

Christophe de Martrin¹, Gérard Vert¹, Michel Chavarot¹, Christel Béra-Maillet², Evelyne Forano¹

Résumé. Cet article décrit un dispositif expérimental conçu pour peser de petits animaux en isolateurs stériles sans sortir les animaux de leur environnement et sans introduire le matériel de pesée pour chaque mesure. Ce dispositif a été conçu et réalisé par les techniciens animaliers de l'installation expérimentale de l'unité de Microbiologie UR454 du Centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix. Il est constitué d'une partie fixe (balance) posée à l'extérieur de l'isolateur et d'une partie mobile (plateau de pesée) disposée dans l'isolateur.

Mots clés : système de pesée, rats, souris, isolateur stérile, gnotobiologie

Introduction

L'installation expérimentale (IE) de l'Unité de Microbiologie UR454 du Centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix est spécialisée depuis sa création (plus de 25 ans) dans la **gnotobiologie**. Cette discipline permet au laboratoire de disposer d'un outil original en expérimentation animale pour étudier les microorganismes qui colonisent le système digestif de l'Homme ou de l'animal (rats, souris, agneaux), ou de tester l'action de bactéries pathogènes.

Problématique

La gnotobiologie est une science permettant de créer différents modèles animaux qui hébergent dans leur système digestif un ensemble déterminé d'espèces microbiennes. Pour cela, les animaux sont élevés dans des enceintes stériles (**Figure 1**) dont l'environnement est contrôlé pour éviter toute contamination extérieure. Les animaux dépourvus de tout microorganisme (animaux **axéniques**) sont ensuite inoculés par un microbiote ou des espèces microbiennes choisies, pathogènes ou non.



Figure 1. Isolateur d'élevage stérile (A) contenant les cages des rongeurs (B).

L'IE développe ainsi différents modèles de souris, de rats et de petits ruminants, axéniques ou à microbiote contrôlé, qui ont été régulièrement utilisés dans le cadre des recherches en

¹ INRA, UR454 Microbiologie, Centre de Clermont-FD/Theix, F-63122 Saint Genès-Champanelle, France
Tel : 04 73 62 55 02, email : dmarttrin@clermont.inra.fr

² Adresse actuelle : INRA, UMR 1319 MICALIS, Jouy en Josas, France

écologie microbienne du rumen et du côlon humain, ou d'étude de pathogénie de souches d'*Escherichia coli* dans l'Unité de Microbiologie (Fonty et al., 2007 ; Béra-Maillet et al., 2009 ; Chassard et al., 2006 ; Der Vartanian et al., 1992). Les techniques de gnotobiologie sont également développées et utilisées dans d'autres centres INRA tels que Jouy en Josas pour l'étude de rats et de souris, ou Tours pour l'étude des volailles. Ces approches nécessitent des personnels très spécialisés et du matériel adapté et coûteux.

L'utilisation de l'expérimentation animale nécessite de disposer d'outils pour apprécier le bon état de santé des animaux. La pesée des animaux est un des critères essentiels de l'évaluation de leur état général, permettant le suivi de l'évolution de leur état sanitaire et, donc, de l'effet d'une pathologie ou d'un traitement. Il est en particulier important de suivre l'état de santé des animaux lors d'études visant à estimer la virulence de souches bactériennes pathogènes intestinales sur le modèle animal testé (rat, souris). Les animaux axéniques ou gnotobiotiques sont difficilement manipulés dans les isolateurs stériles, pour des raisons ergonomiques. Seuls le contrôle visuel et la pesée de l'animal peuvent donc renseigner rapidement et sans acte invasif sur leur état sanitaire.

Pour pouvoir peser ces animaux en isolateurs stériles, l'IE de l'Unité de Microbiologie disposait d'un système de plateau à balancier (type Roberval) avec son jeu de poids en laiton (masse minimale de 1 g) dont l'utilisation était « lourde » compte-tenu des contraintes liées à la manipulation des animaux en isolateurs stériles. Les pesées effectuées avec ce système n'étaient pas suffisamment précises, d'une part parce que les animaux bougeaient beaucoup sur le plateau, entraînant des difficultés d'ajustage du contre-plateau avec les poids en laiton, et, d'autre part, car la précision de la mesure était limitée à 1 g. De plus, le manipulateur devait retirer ses mains des gants de l'isolateur après chaque pesée afin de noter le poids de l'animal. Cela représentait une perte de temps importante pour le manipulateur.

Bien que ce système soit encore couramment utilisé en expérimentation animale de nos jours, l'IE de l'Unité de Microbiologie a imaginé et mis au point un système original et unique de pesée des animaux. Ce système dénommé « SYStème de Pesée Automatique » (SYSPA), tient non seulement compte des contraintes de manipulation imposées par la gnotobiologie, mais simplifie également le processus de pesée en apportant une économie de temps et une bonne précision de la mesure.

Cahier des charges

Le SYSPA a dû tenir compte des contraintes suivantes, liées aux caractéristiques du travail en isolateur stérile :

- liberté de mouvement réduite pour peser les animaux au sein d'un isolateur stérile,
- nécessité de préserver l'étanchéité de l'isolateur pour éviter toute contamination des animaux en expérimentation à l'intérieur de l'isolateur stérile,
- éviter tout effet de la pression interne dans l'isolateur sur la valeur mesurée,
- nécessité de stériliser le plateau de pesée.

Il a également dû prendre en considération l'amélioration du travail des animaliers :

- éviter une gestuelle lourde pour effectuer les pesées (éviter de sortir des gants de l'isolateur pour tarer la balance, écrire la valeur de la mesure...),
- permettre des mesures répétées et rapides pour limiter les perturbations de la mesure dues aux mouvements de l'animal sur le plateau de pesée,
- permettre l'enregistrement des données,
- mettre au point un système mobile pouvant être déplacé et positionné rapidement sur plusieurs isolateurs différents.

Enfin, ce nouveau système de pesée devait être économiquement rentable et donc fabriqué dans l'atelier de mécanique de l'IE.

Description du système de pesée

Description

Les balances électroniques ne supportent pas les stérilisations à la vapeur et peuvent également être endommagées par les stérilisations chimiques. Il n'était donc pas possible d'envisager d'utiliser ces méthodes pour nos expérimentations animales qui nécessitent de pouvoir stériliser rapidement le matériel pour le réutiliser aussitôt. Il fallait inventer un système qui permette de positionner la balance électronique à l'extérieur de l'isolateur. De plus, compte-tenu du coût d'une balance électronique, il était souhaitable de ne pas multiplier les balances, et donc de pouvoir déplacer une balance d'un isolateur à l'autre.

Pour le SYSPA, il a donc été prévu un système de transmission complet, résidant en permanence dans chaque isolateur stérile, et relié par un sas étanche à la balance électronique (**Figures 2 et 3**). Les isolateurs d'expérimentation sont, eux, munis en leur sommet d'une tubulure spécifique (tubulure de raccordement) sur laquelle vient se fixer le système de pesée.

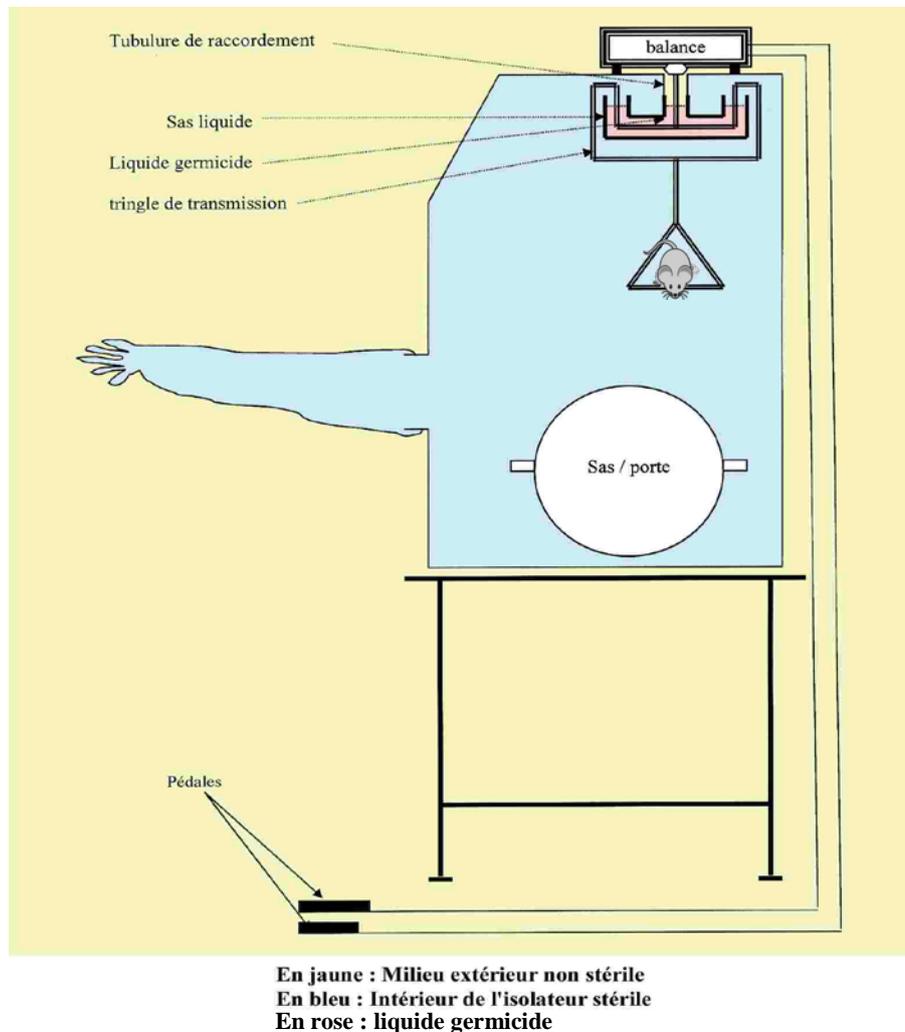


Figure 2. Schéma du système de pesée de rongeurs en isolateur stérile, SYSPA.

Le SYSPA est composé de :

- une balance électronique possédant certaines caractéristiques : un programme spécifique de « pesée d'animaux », de façon à prendre automatiquement la mesure de 10 pesées successives d'un animal et d'en calculer la moyenne ; une précision de l'ordre du dixième de gramme ; une sortie sur la face inférieure (dessous) de la machine sur laquelle peut être connecté un système de transmission ;
- une imprimante reliée à la balance, l'ensemble pouvant être commandé par deux interrupteurs à pied qui agissent sur les fonctions « tare » et « mesure+impression » de la balance. Ces interrupteurs constituent une évolution importante du système car ils évitent au manipulateur de sortir les mains des gants de l'isolateur pour noter les valeurs de pesée de l'animal et donc de perdre un temps considérable ;
- la balance peut également être directement reliée à un ordinateur pour le stockage des données et des calculs ultérieurs ;
- un système de transmission composé d'un sas liquide en forme de « T renversé » et d'une tringlerie passant dans un liquide germicide (**Figure 3**) ;
- une tringle fixée à la tringlerie interne par un crochet, et supportant un plateau de pesée pour les animaux (**Figure 3**).



Figure 3. Photos du SYSPA lors de la pesée d'un rat.

Montage

Pour assembler le SYSPA, il est nécessaire de respecter un ordre précis tenant compte des contraintes de stérilité de l'ensemble.

Le sas et sa tringlerie interne sont tout d'abord fixés sur la tubulure de l'isolateur non stérile avec du ruban adhésif lors de la préparation de l'isolateur. La tubulure est fermée (côté extérieur de l'isolateur) par un bouchon. L'assemblage de l'isolateur est ensuite poursuivi (montage des gants et des filtres) puis celui-ci est stérilisé par voie chimique (cycle de stérilisation au formol en atmosphère confinée). Puis, le sas du système de pesée est rempli avec une solution d'eau stérile contenant un germicide (par exemple 2% de désogermine), par l'intérieur de l'isolateur. A ce stade, le bouchon de la tubulure peut être enlevé, car l'intérieur stérile de l'isolateur est protégé par la présence du sas liquide.

La tringle de transmission du système est alors assemblée sur la tringlerie interne et la balance électronique est placée sur le dessus de l'isolateur d'expérimentation. Le système de pesée est ensuite raccordé à la balance et, ainsi, prêt à fonctionner.

La partie du SYSPA présente dans l'isolateur est autoclavable (décontamination aisée du matériel). Le SYSPA est utilisé régulièrement au sein de l'unité de Microbiologie depuis de nombreuses années et n'a jamais provoqué de contamination des isolateurs.

Utilisation

Pour peser un animal, il faut respecter la démarche suivante.

Les animaux doivent tout d'abord être identifiés (marquage) pour être toujours pesés dans le même ordre au cours des expérimentations. Un bécher peut être disposé sur le plateau de pesée dans le cas de pesées de souris afin de contenir les mouvements de l'animal, et la tare est alors effectuée à l'aide de l'interrupteur à pied de la balance. L'animal est ensuite placé dans le bécher et sa pesée est effectuée en appuyant sur le deuxième interrupteur à pied de la balance (lecture et impression des pesées).

Applications - Validation

Le SYSPA est utilisé depuis plusieurs années dans l'Installation Expérimentale pour suivre l'évolution du poids de souris ou de rats au cours de différents types d'expérimentations : évaluation de l'effet d'infections expérimentales (Kmet et al., 1995 ; Vareille, 2008), ou de xénogreffes chez la souris (Schubert et al., 2008) ; impact de différents microbiotes intestinaux chez le rat (Chassard et al., 2006), suivi de rats à microbiote intestinal humain (de Sablet et al., 2009).

Ce système pourra être très facilement adapté à tout isolateur en vue d'élever ou d'expérimenter des petits animaux dans des conditions d'axénie ou de gnotobiologie. Il pourra également être adapté à des isolateurs à enveloppe souple sous réserve d'aménager un support rigide pour la balance sur la partie haute de l'isolateur.

Références bibliographiques

Béra-Maillet C, Mosoni P, Kwasiborski A, Suau F, Ribot Y, Forano E (2009) Development of a RT-qPCR method for the quantification of *Fibrobacter succinogenes* S85 glycoside hydrolase transcripts in the rumen content of gnotobiotic and conventional sheep. *J Microbiol Methods* **77**: 8-16.

Chassard C, Del'Homme C, Marquet P, Dapoigny M, Bommelaer G, Bernalier-Donadille A (2006) An animal model that reproduces microbial disruption observed in the gut of IBS subjects : a new animal model of IBS ? *Reprod Nutr Develop* **46**:S9.

Der Vartanian M, Jaffeux B, Contrepois M, Chavarot M, Girardeau JP, Bertin Y, Martin C (1992) Role of aerobactin in systemic spread of an opportunistic strain of *Escherichia coli* from the intestinal tract of gnotobiotic lambs. *Infect Immun* **60**: 2800-2807.

de Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, Vareille M, Gobert AP, Martin C (2009). Human Microbiota-Secreted Factors Inhibit Shiga-Toxin Synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **77**: 783-790.

Fonty G, Joblin K, Chavarot M, Roux R, Naylor G, Michallon F (2007) Establishment and development of ruminal hydrogenotrophs in methanogens-free lambs. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6391-6403.

Kmet V, Kmetová M, Contrepois M, Ribot Y (1995) *Bifidobacteria* and *Escherichia coli* translocation in gnotobiotic mice. *Adv Exp Med Biol* **371A**:479-482.

Schubert B, Canis M, Darcha C, Artonne C, Smitz J, Grizard G (2008) Follicular growth and estradiol follow-up after subcutaneous xenografting of fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril* **89**: 1787-1794.

Vareille M (2008) La réponse immunitaire mucoale intestinale lors de l'infection par les *Escherichia coli* entérohémorragiques : rôle et régulation de la synthèse du monoxyde d'azote. Thèse de l'Université d'Auvergne, Ecole doctorale des Sciences de la vie et de la santé.