



UNIVERSITÉ
LAVAL

Direction des services vétérinaires

Procédure normalisée de fonctionnement

Objet : Génotypage de rats et souris transgéniques	Numéro : TS-1a
Portée : Ceci est une directive de la Direction des services vétérinaires à l'intention des utilisateurs et du personnel des animaleries de l'Université Laval (campus et centres de recherche affiliés).	
Préparée par Anne-Marie Catudal <i>Vétérinaire clinicienne, Direction des services vétérinaires</i>	Date : 1 ^{er} août 2013
Modifiée par Annie-Christine Fillion <i>Technicienne en santé animale conformité, Direction des services vétérinaires</i>	Date : 1 ^{er} février 2023
Révisée par Anne-Marie Catudal <i>Vétérinaire clinicienne, Direction des services vétérinaires</i>	Date : 14 février 2023
But : Décrire la procédure de génotypage chez le rat et la souris transgéniques.	Version 3

Généralités

- Le génotypage sert à déterminer la constitution génétique d'un animal modifié génétiquement et surveiller la dérive génétique d'un élevage. (Lignes directrices du CCPA sur les souris et sur les rats)
- Le choix de la méthode doit dépendre de la possibilité de réduire au minimum la douleur et la détresse de l'animal, de la quantité de tissus nécessaire et de la possibilité de combiner la manipulation à l'identification de l'animal. (Lignes directrices du CCPA sur les souris et sur les rats)
- Le succès du génotypage dépend d'un échantillon adéquat, des mesures empêchant toute contamination entre les échantillons et des mesures qui évitent la dégradation des échantillons. (Lignes directrices du CCPA sur les souris et sur les rats)
- Lorsque l'étude le permet, les techniques moins invasives comme la collecte de follicules pileux, de sang ou encore la prise d'échantillon fécal ou oral doivent être prioritaires.
- Un génotypage par PCR (Polymerase Chain Reaction) requiert moins d'ADN qu'un Southern Blot.
- Il est recommandé d'effectuer le génotypage sur des animaux de 10 à 21 jours afin de diminuer la douleur ressentie. Cela a aussi comme avantage de cibler les animaux à garder avant le sevrage. La quantité d'ADN libérée est aussi maximale à cette période.

- Pour les manipulateurs inexpérimentés ou pour les lignées de plus petite taille, il est recommandé de procéder après 14 jours.
- Des biopsies répétées nécessitent une justification auprès du CPAUL.

Méthodes et procédures

Échantillon de fèces

- Méthode non invasive et simple, utile si peu d'animaux doivent être génotypés et qu'une identification n'est pas nécessaire.
- Cette méthode comporte des risques de contamination croisée et n'est pas fiable pour toutes les constructions génétiques.
- Les échantillons doivent être analysés dans les 24 h après la récolte et le génotypage requiert souvent plusieurs fèces par animal pour être efficace.
- Prendre des fèces qui sortent de l'animal à la suite de la manipulation ou mettre l'animal dans une cage propre pendant une à deux minutes et récolter les fèces ensuite.

Échantillon de salive et de cellules buccales

- Méthode peu invasive et simple, utile si peu d'animaux doivent être génotypés et qu'une identification n'est pas nécessaire.
- L'échantillon peut être récolté par pipette ou frottis buccal avec un coton-tige.
- Les cellules buccales des animaux non sevrés pourraient être contaminées par l'ADN de la mère après l'allaitement ou par du sang en cas de blessure buccale.

Échantillon de follicules pileux

- Méthode peu invasive et simple, utile si peu d'animaux doivent être génotypés et qu'une identification n'est pas nécessaire.
- Prélever des poils à l'aide d'une pince désinfectée/stérilisée sur l'abdomen de l'animal.
- Cette méthode comporte des risques importants de contamination croisée.

Échantillon de sang

- Voir les PNF [P-1 Prélèvements sanguins chez le rat](#), [P-2 Prélèvements sanguins chez la souris](#) et [P-16 Procédure générale pour les prélèvements sanguins](#).
- Ne pas faire chez des animaux de moins de 14 jours.
- Une formation spécialisée sur les techniques de prélèvements sanguins doit préalablement être suivie et à jour au dossier de formation du manipulateur.

Biopsie de l'oreille

- Nettoyer et désinfecter/stériliser un poinçon d'oreille et une paire de pinces.
- Contentionner l'animal afin de limiter les mouvements de la tête.
- Appliquer le poinçon à l'endroit voulu sur l'oreille et récupérer la biopsie. Il est possible de s'aider avec les pinces au besoin.
- Replacer l'animal dans sa cage et noter sur le carton et/ou dans la base de données les informations relatives à son identification, au besoin.
- Nettoyer et désinfecter/stériliser les outils entre chaque animal.

Biopsie de la queue

- Lors d'une biopsie de la queue, si un anesthésique local est utilisé, toujours vérifier le temps d'action requis avant de commencer la biopsie.
- Un maximum de 5 mm peut être prélevé lors d'une biopsie de la queue.
- Si de l'ADN supplémentaire est requis à la suite d'une biopsie de queue, des alternatives à une seconde biopsie de queue doivent être prioritaires (poinçon d'oreille, prélèvement de poil, etc.).
- Des biopsies de queue répétées nécessitent une anesthésie générale et de l'analgésie.
- Anesthésie/analgésie :
 - Animaux de 10 à 21 jours : l'anesthésie locale est fortement recommandée.
 - Animaux de 22 à 31 jours : l'anesthésie locale est obligatoire.
 - Animaux de 31 jours et plus : l'anesthésie générale et l'administration d'un analgésique pour un niveau de douleur attendu de 2 sont obligatoires. Voir [PNF A-1 Analgésie et anesthésie des rongeurs](#) (Réf. tableau 1 ou tableau 2, plan analgésique 2)
- Anesthésie locale :
 - Tremper la queue dans de l'éthanol sur glace pendant 10 secondes ou;
 - Appliquer un vaporisateur de chloroéthane (chlorure éthylique) et attendre le délai requis par le fabricant pour assurer l'anesthésie, ou;
 - Appliquer un anesthésique local comme la lidocaïne vaporisée et attendre 1 minute avant d'effectuer la biopsie, ou autre selon les directives du vétérinaire.
- Désinfecter le bout de la queue avec une gaze d'alcool ou de chlorhexidine.
- Avec une lame de scalpel, une lame de rasoir ou une paire de ciseaux stérile, exciser 2 mm de la queue.
- Au besoin, contrôler le saignement par cautérisation, en effectuant une pression ou avec une poudre hémostatique.
- Vérifier l'arrêt du saignement et retourner l'animal dans sa cage d'hébergement si aucun saignement n'est observé après 2 minutes.

- Nettoyer et désinfecter/stériliser les outils entre chaque animal. Si une surface de travail est utilisée, nettoyer et désinfecter la surface entre chaque animal pour diminuer les risques de contamination des échantillons multiples et ainsi diminuer les risques d'erreur de génotypage.

Références

CCPA, Lignes directrices du CCPA : les souris, 2019.

CCPA, Lignes directrices du CCPA : les rats, 2020.

Hankenson FC, Braden-Weiss GC, Blendy JA. *Behavioral and Activity Assessment of Laboratory Mice (Mus musculus) after Tail Biopsy under Isoflurane Anesthesia*, JAALAS, 2011.

Joint Working Group on Refinement, *Refinement and reduction in production of genetically modified mice*, Laboratory Animals, 2003.

Office of animal care and use, ARAC guidelines, *Guidelines for genotyping mice and rats*, 2010.

Articles utiles

Cinelli P, et al. *Comparative Analysis and Physiological Impact of Different Tissue Biopsy Methodologies Used for the Genotyping of Laboratory Mice*, Lab Animals, 41:174-184. 2007.

Kalippke K. *DNA analysis from stool samples: a fast and reliable method avoiding invasive sampling methods in mouse models of bleeding disorders*. Lab Animals, 2009.

Lahm H, Hoeflich A, Rieger N, Wanke R, Wolf E. *Identification of transgenic mice by direct PCR analysis of lysates of epithelial cells obtained from the inner surface of the rectum*. Transgenic Research 7, 131.4, 1998.

Meldgaard M, Bollen PJA, Finsen B. *Non-invasive method for sampling and extraction of mouse DNA for PCR*. Laboratory Animals, 38, 413-417, 2004.

Mitrecic D et al. *Mice Genotyping Using Buccal Swab Samples: An Improved Method*, Biochem Genetics 46:105-112, 2008.

Schmitteckert EM, Prokop CM, Hedrich HJ. *DNA detection in hair of transgenic mice – a simple technique minimizing the distress on the animals*. Lab Animal, 33(4): 385-9, 1999.

Schneider M, Wolf E. *Genotyping of transgenic mice: Old principles and recent developments*, Analytical Biochemistry 344 1-7, 2005.

Zhang YH, Huang BL, Eastman K, McCabe LL, MacLennan NK, McCabe ERB. *Mouth cell collection device for newborn mice*. *Molecular Genetics and Metabolism* 89, 164.167, 2006.

Zimmermann, K, Schwarz HP, Turecek PL. *Deoxyribonucleic Acid Preparation in Polymerase Chain Reaction Genotyping of Transgenic Mice*. *Comparative Medicine*, 50(3), 314-316, 2000.

Mises à jour de la PNF		
Version 2	11 janvier 2016	Ajout de l'analgésie obligatoire pour les souris de 31 jours et plus.
Version 3	14 février 2023	PNF scindée en deux : TS-1a rats et souris et TS-1b poissons-zèbres. Ajout de généralités. Ajout des sections échantillon fécal, oral, follicules pileux et sang. Précisions des biopsies d'oreilles et de queue.