



UNIVERSITÉ
LAVAL

Direction des services vétérinaires

Procédure normalisée de fonctionnement

Objet : Défaite sociale répétée chez la souris

Numéro : M-6

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

Vétérinaire clinicienne, Direction des services vétérinaires

Date : 12 mars 2019

Révisée par Caroline Ménard

Professeure sous octroi adjointe, Faculté de médecine

Date : 23 mai 2019

But : Décrire les procédures et points limites pour le modèle de stress social induit par la défaite sociale répétée chez la souris.

Version 1

Généralités

- Pour tout nouvel utilisateur, la défaite sociale répétée doit être supervisée à quelques reprises par un collègue avec de l'expérience pour cette PNF (identifié comme tel dans le protocole approuvé par le CPAUL), jusqu'à ce que l'utilisateur soit jugé autonome.
- Ce modèle a été développé afin d'étudier le stress social chez les souris.
- Les souris témoins et à tester devraient être âgées entre 2 et 4 mois pour un poids \approx 20-30 g.
- Les souris témoins et à tester ne doivent pas avoir été hébergées dans un environnement enrichi depuis la naissance, puisque cela augmente la résilience au test.
- Les partenaires d'interaction sont des mâles reproducteurs à la retraite CD-1 de plus de 4 mois idéalement. Le succès du protocole dépend de la sélection des CD-1, qui doivent avoir un comportement agressif approprié et constant et une taille et un poids supérieurs aux animaux testés (\approx 40 g).
- Compte tenu de la variabilité du niveau d'agression, il faut prévoir environ 50 % de CD-1 de plus. Il est important de prévoir des CD-1 supplémentaires si un des agresseurs s'avère trop agressif lors de la défaite. Par exemple, pour une cohorte de 20 souris subissant le stress social, prévoir un minimum de 30 mâles CD-1 ainsi que 10 souris C57BL/6 « screener », âgées de 6 à 10 semaines. Deux agresseurs supplémentaires sont également nécessaires pour le test d'interaction sociale (la nouveauté est importante).

- Toutes les souris doivent être hébergées dans la salle de test un minimum de 48 heures avant la mise en place du protocole ainsi que durant l'intégralité de ce dernier.
- Les animaux témoins qui ne subissent pas le stress seront hébergés dans la même salle, en hébergement double.
- Lors de l'hébergement double, chaque animal aura sa propre bouteille d'eau et un accès illimité à la nourriture.
- Les cages ne devront pas être changées durant les 10 jours du protocole.

Matériel

- Cages à hamster;
- Cages à souris;
- Séparateurs perforés en Plexiglas transparent, adaptés à l'axe longitudinal de la cage à hamster;
Note : le séparateur doit épouser parfaitement les formes de la cage et prévenir l'évasion des animaux.
- Litière de fine cope de bois;
- Matériel de nidification Enviro-dri®;
- Grillage, nourriture et bouteilles d'eau;
Note : Le grillage doit être bien positionné afin d'éviter l'évasion des animaux.
- Couvercles transparents;
- Caméra et système automatisé d'analyse de mouvement;
- Aréna Open Field.

Procédure

Screening des CD-1

- Acclimater les CD-1 pendant une semaine en hébergement individuel dès la réception en leur donnant accès à de la nourriture, de l'eau et du matériel de nidification. Retirer le couvercle 48 h avant le screening et ne pas changer les cages jusqu'à la fin du screening.
- Héberger les C57BL/6 « *screeners* » en groupe en leur donnant accès à de la nourriture, de l'eau et du matériel de nidification et leur cage est couverte.
- Peser les souris avant le début du screening.
- Retirer le nid de la CD-1 et placer une souris « *screeener* » dans sa cage.

- Retirer la souris « *screener* » quelques secondes après le début de l'agression et noter le délai d'attaque sur la carte de la CD-1. Le temps maximal durant lequel la souris « *screener* » est laissée avec la CD-1 est de 3 minutes.
- Remettre la souris « *screener* » avec son groupe et remettre le nid de la CD-1.
- Au jour 2, refaire le test avec une nouvelle souris « *screener* ». Noter le délai d'attaque sur la carte de la CD-1.
- Refaire le test une dernière fois au jour 3 avec une nouvelle souris « *screener* ». Noter le délai d'attaque sur la carte de la CD-1.
- Catégoriser les CD-1 selon leur niveau d'agressivité :
 - Trop agressives si elles attaquent de façon continue en maintenant le « *screener* » au sol pendant une période prolongée;
 - Très agressives si elles attaquent les 3 jours, et le 3^e jour en moins de 10 s;
 - Agressives si elles attaquent les 3 jours, et le 3^e jour en plus de 10 s;
 - Variable si elles attaquent seulement 2 jours sur 3.
- Sélectionner les CD-1 qui, durant les 3 jours de screening, ont attaqué au moins 2 jours consécutifs.
- Exclure les CD-1 du protocole de défaite sociale :
 - Si elles ont démontré un comportement sexuel envers le « *screener* »;
 - Si elles sont catégorisées trop agressives.
- Utiliser les CD-1 pour un maximum de 5 protocoles de défaite sociale. Effectuer une journée de screening avant les protocoles de défaite sociale subséquents et sélectionner les CD-1 qui attaquent en moins de 3 minutes.
- Utiliser les « *screeners* » jusqu'à un âge approximatif de 3 mois, lorsque les CD-1 ne les attaquent plus en raison de leur taille.

Animaux témoins

- Acclimater les animaux pendant une semaine en hébergement en groupe dès la réception en leur donnant accès à de la nourriture, de l'eau et du matériel de nidification. Couvrir la cage.
- Mettre en place les cages à hamster d'hébergement double, sans couvercle, en installant un séparateur perforé au centre de chaque cage propre. Chaque animal doit avoir accès à sa propre nourriture et bouteille d'eau, mais pas de matériel de nidification.
- Peser les animaux lors du transfert dans les cages.
- Placer les animaux témoins destinés à l'hébergement double de part et d'autre du séparateur sans les mettre en contact direct et s'assurer de l'étanchéité du montage.

- Chaque jour, changer les animaux de compartiment et/ou de cage de façon similaire aux animaux subissant la défaite sociale, en empêchant les contacts physiques.
Note : Deux souris ne devraient pas partager une cage plus d'une fois.
- Après 10 jours, peser les animaux et les isoler dans des cages standard propres, un par cage, sans matériel de nidification.

Défaite sociale

Mâles

- Acclimater les animaux pendant une semaine en hébergement en groupe dès la réception en leur donnant accès à de la nourriture, de l'eau et du matériel de nidification. Couvrir la cage.
- Mettre en place les cages à hamster d'hébergement double, sans couvercle, en installant un séparateur perforé au centre de chaque cage propre. Chaque animal doit avoir accès à sa propre nourriture et bouteille d'eau.
- Vingt-quatre heures avant le début de la défaite sociale, placer chacune des souris CD-1 d'un côté d'une cage à hamster propre séparée, sans couvercle, en laissant l'autre côté vide. Transférer l'animal avec son nid.
Note : Distribuer les CD-1 selon leur niveau d'agressivité (tel qu'évalué lors de la phase de screening) afin que le niveau d'agression soit distribué relativement également dans la cohorte, tout en demeurant imprévisible pour la souris testée.
- Au jour 1 de la défaite, retirer le nid de la CD-1. Peser et introduire une souris de la lignée testée dans la cage de la CD-1 du côté vide.
- Lorsque toutes les souris à tester sont distribuées, transférer la 1^{re} souris du côté de la CD-1. S'assurer de l'étanchéité du montage.
- Laisser la souris CD-1 établir sa position de dominance durant 2-10 minutes selon le niveau d'agression de la cohorte. Idéalement, le temps d'exposition doit être le même pour l'ensemble de la cohorte sauf si un niveau d'agression exagéré nécessite une intervention et la fin prématurée de l'interaction physique.
Important : Pour tout nouvel utilisateur, la défaite sociale répétée doit être supervisée à quelques reprises par un collègue avec de l'expérience pour cette PNF.
Note : Si une CD-1 attaque de façon continue en maintenant la souris testée sur le sol pendant une période prolongée, exclure la CD-1 de la défaite. Si nouvel utilisateur, demander la confirmation du comportement et la nécessité d'exclusion par un collègue avec de l'expérience.
- À la fin de l'interaction physique, transférer la souris testée du côté vide, sans matériel de nidification.
- Remettre le nid de la CD-1. Mettre le grillage, la nourriture et deux bouteilles d'eau. S'assurer de l'étanchéité du montage.

- Placer les cartons d'identification des 2 souris sur la cage.
- Vérifier l'état de santé des souris en observant leur mouvement et leur comportement et compléter le formulaire de suivi de santé (voir annexe 1).
- Au jour 2, retirer les bouteilles et le grillage. Retirer le nid de la CD-1. Placer la bouteille de la souris testée, ainsi que son carton d'identification, à l'écart.
- Placer chacune des souris testées directement dans le compartiment d'une autre CD-1 durant 2-10 minutes, selon le niveau d'agression de la cohorte.
- Reproduire le protocole pour une durée de 10 jours afin que chaque souris testée ait été en contact avec 10 souris CD-1 différentes.
- Immédiatement après la dernière interaction physique, peser les animaux et les isoler dans des cages standard propres sans couvercle, un par cage, sans matériel de nidification pour les souris testées.
- Laver tout le matériel utilisé pour l'hébergement des animaux.

Femelles

- Acclimater les animaux pendant une semaine en hébergement en groupe en leur donnant accès à de la nourriture, de l'eau et du matériel de nidification. Couvrir la cage.
- Mettre en place les cages à hamster d'hébergement double, sans couvercle, en installant un séparateur perforé au centre de chaque cage propre. Chaque animal doit avoir accès à sa propre nourriture et bouteille d'eau.
- Vingt-quatre heures avant le début de la défaite sociale, placer chacune des souris CD-1 d'un côté d'une cage à hamster propre séparée, sans couvercle, en laissant l'autre côté vide. Transférer l'animal avec son nid.
Note : Distribuer les CD-1 selon leur niveau d'agressivité (tel qu'évalué lors de la phase de screening) afin que le niveau d'agression soit distribué relativement également dans la cohorte, tout en demeurant imprévisible pour la souris testée.
- Au jour 1 de la défaite, retirer le nid de la CD-1. Peser et introduire une souris de la lignée testée dans la cage de la CD-1 du côté vide.
- Lorsque toutes les souris à tester sont distribuées, appliquer 20 ul d'urine de mâle CD-1 agressif sur la base de la queue et l'orifice vaginal des femelles à tester puis transférer la 1^{re} souris du côté de la CD-1. S'assurer de l'étanchéité du montage.
Note : L'urine est préalablement récoltée de souris CD-1 autres que celles utilisées pour la défaite sociale.
- Laisser la souris CD-1 établir sa position de dominance durant 2-10 minutes, selon le niveau d'agression de la cohorte. Idéalement, le temps d'exposition doit être le même pour l'ensemble de la cohorte sauf si un niveau d'agression exagéré nécessite une intervention et la fin prématurée de l'interaction physique.

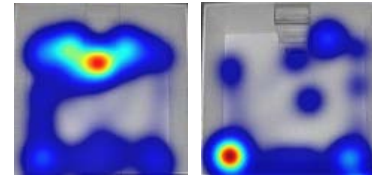
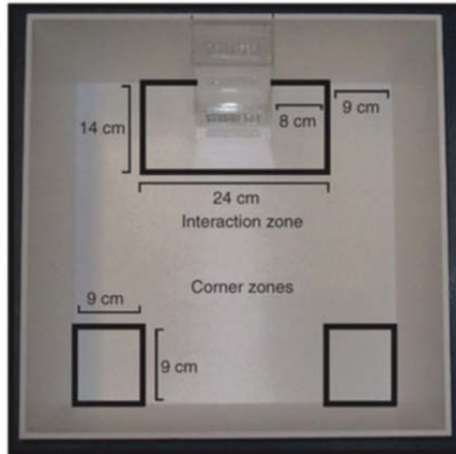
Important : Pour tout nouvel utilisateur, la défaite sociale répétée doit être supervisée à quelques reprises par un collègue avec de l'expérience pour cette PNF.

Note : Si une CD-1 monte la femelle testée, mettre immédiatement fin à l'interaction physique.

- À la fin de l'interaction physique, transférer la souris testée du côté vide, sans matériel de nidification.
- Remettre le nid de la CD-1. Mettre le grillage, la nourriture et deux bouteilles d'eau. S'assurer de l'étanchéité du montage.
- Placer les cartons d'identification des 2 souris sur la cage.
- Vérifier l'état de santé des souris en observant leur mouvement et leur comportement et compléter le formulaire de suivi de santé (voir annexe 1).
- Au jour 2, retirer les bouteilles et le grillage. Retirer le nid de la CD-1. Placer la bouteille de la souris testée, ainsi que son carton d'identification, à l'écart.
- Appliquer 20 ul d'urine de mâle CD-1 agressif sur la base de la queue et l'orifice vaginal des femelles à tester puis transférer la 1^{re} souris directement dans le compartiment d'une autre CD-1 pour une période de 2-10 minutes, selon le niveau d'agression de la cohorte.
- Reproduire le protocole pour une durée de 10 jours afin que chaque souris testée ait été en contact avec 10 souris CD-1 différentes.
- Immédiatement après la dernière interaction physique, peser les animaux et les isoler dans des cages standard propres sans couvercle, un par cage, sans matériel de nidification pour les souris testées.
- Laver tout le matériel utilisé pour l'hébergement des animaux.

Évaluation de l'état dépressif

Le test d'interaction sociale est utilisé pour évaluer la susceptibilité versus la résilience au stress à la suite de la défaite sociale répétée. L'arène est une aire ouverte délimitée par 4 murs en Plexiglas. Une petite cage en Plexiglas avec un grillage est placée au milieu d'un des murs de l'arène. La cage doit être assez grande pour contenir une souris CD-1. Le grillage permet des interactions sensorielles de la CD-1 avec la souris testée tout en évitant des contacts physiques. Une zone d'interaction et des coins sont définis selon les paramètres décrits dans Golden et al. (2011). Les mouvements de la souris sont mesurés avec un système automatisé de détection de mouvement.



SI \geq 1 = résilient
SI < 1 = stress-susceptible

Social interaction (SI) ratio : temps passé dans la zone d'interaction (en vert) quand une CD-1 est présente/absente. Les coins sont représentés en orange.

- Placer les souris testées ou témoins une à la fois dans un aréna en Plexiglas.
- Pour la phase 1, placer la souris testée dans l'aréna pour 2:30 min en absence d'une souris CD-1 dans la petite cage avec grillage.
- À la fin des 2:30 min, remettre la souris testée dans sa cage et nettoyer l'aréna.
- Pour la phase 2, placer une souris CD-1 jamais rencontrée dans la petite cage avec grillage et remettre la souris testée dans l'aréna pour 2:30 min.
- À la fin de la phase 2, remettre les deux souris dans leur cage respective et nettoyer l'aréna et la petite cage.
- Répéter le test d'interaction sociale pour toutes les souris testées et témoins.
- Calculer le ratio d'interaction sociale en divisant le temps passé dans la zone d'interaction pendant la phase 2/phase 1. Les souris testées présentant un ratio \geq 1 sont considérées résilientes alors que les souris présentant un ratio < 1 sont considérées susceptibles au stress (« déprimées »). Les souris témoins devraient en général avoir un ratio \geq 1.
- Si prévus au protocole, effectuer d'autres tests liés à l'anxiété et aux comportements dépressifs.
- Après l'euthanasie, documenter les plaies selon l'annexe 2.

Suivi et points limites

- Porter une attention particulière aux CD-1 qui deviennent trop agressives et retirer ces dernières du protocole.
- Suivre les animaux de près durant les protocoles de défaite sociale. Les TSA de l'animalerie doivent effectuer au moins une observation par jour, idéalement dans l'heure suivant l'épisode de défaite sociale. Une attention particulière doit être portée à l'état général, l'état de chair et aux plaies cutanées. Si l'examen d'un animal semble nécessaire, contacter l'équipe de recherche avant de le manipuler.

- Lors de la séparation des animaux après un épisode de défaite, palper délicatement le bas du dos et observer les organes génitaux pour détecter des lésions.
Note : Le personnel de l'équipe de recherche doit être formé par un vétérinaire pour le suivi des plaies et la complétion du formulaire de suivi de santé.
- Les animaux présentant les signes suivants, incluant les « *screeners* », doivent être traités pour plaie de bataille majeure selon la PNF TX-1 ou euthanasiés :
 - Plaie de plus de 1 cm;
 - Atteinte aux organes génitaux;
 - Enflure d'un membre.
- Les animaux présentant les signes suivants, incluant les « *screeners* », doivent être euthanasiés :
 - Atteinte sévère au pénis;
 - Mauvais état général (animal peu actif et/ou dos voûté et/ou poils ébouriffés);
 - Perte de poids de plus de 20 % associée à un état de chair $\leq 2/5$.

Références

Golden, S.A, et al. *A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice*, Nature Protocols; 6(8): 1183-1191, 2011.

Harris, A.Z. et al., *A Novel Method for Chronic Social Defeat Stress in Female Mice*, Neuropsychopharmacology; 43, 1276–1283, 2018.

McGill University, *SOP 4016.01 – Social Defeat Model*, 2018.

Annexe 2

Documentation des plaies cutanées lors de la collecte de tissus

Après l'euthanasie, les plaies cutanées et autres signes cliniques doivent être documentés au moment de la collecte de tissus et des comparaisons statistiques doivent être effectuées entre les groupes de souris susceptibles et résilientes. Une valeur pour chaque souris est obtenue en additionnant :

- La longueur de la plaie (ou surface de morsures) dans le bas du dos
- Le nombre (#) de morsures sur le haut du dos
- Le nombre (#) de morsures sur l'abdomen
- Le nombre (#) de morsures sur la queue

Bas du dos (Plaies ou morsures)		Haut du dos	
Longueur (cm)	Points	Nb morsures	Points
0	0	0	0
0,1-0,5	1	1-5	1
0,5-1	2	5-10	2
1+	3	10+	3
Abdomen		Queue	
Nb morsures	Points	Nb morsures	Points
0	0	0	0
1-5	1	1-5	1
5-10	2	5-10	2
10+	3	10+	3