



UNIVERSITÉ
LAVAL

Direction des services vétérinaires

Procédure normalisée de fonctionnement

Objet : Modèle d'infection intranasale avec le virus herpès simplex 1 pour induire une encéphalite herpétique	Numéro : M-13
Portée : Ceci est une directive de la Direction des services vétérinaires (DSV) à l'intention des utilisateurs et du personnel des animaleries de l'Université Laval (campus et centres de recherche affiliés).	
Préparée par Daphnée Veilleux-Lemieux <i>Vétérinaire responsable, Direction des services vétérinaires</i>	Date : 11 mai 2022
Révisée par : Jocelyne Piret Professionnelle de recherche de l'équipe du Dr Guy Boivin <i>Professeur titulaire, Faculté de Médecine</i>	Date : 30 juin 2022
Révisée et approuvée par : CUPA, avec modifications	Date : 22 septembre 2022
But : Décrire les procédures pour le modèle d'infection intranasale avec le virus herpès simplex 1 pour induire une encéphalite herpétique chez la souris.	Version 1

Généralités

- L'encéphalite induite par le virus herpès simplex 1 (HSV-1) est l'une des causes les plus fréquentes d'encéphalite nécrosante chez l'homme.
- Le HSV-1 est un virus neurotrope à ADN, établissant un état latent généralement dans les ganglions du trijumeau suivi de réactivations périodiques.
- L'instillation intranasale du virus herpès simplex permet le développement d'une encéphalite herpétique (HSE). Sa distribution potentielle aux poumons peut néanmoins causer des signes systémiques indésirables. D'autres voies d'administration sont également possibles (ex. injection intracérébrale).
- Les souris C57BL/6 sont considérées comme étant résistantes à l'infection. Les souris BALB/c ainsi que les jeunes souris sont davantage susceptibles. Les souris déficientes en immunité innée pourraient l'être aussi.
- La période critique pour les BALB/c se situe normalement entre le jour 4 et le jour 7 post-infection. La fréquence d'observations au cours de cette période critique doit être augmentée.
- Des lésions orofaciales peuvent être observées lors de l'instillation intranasale de HSV-1. Des ulcères cornéens sont aussi possibles. Il est essentiel de surveiller tous les signes d'atteintes faciales et oculaires pour une prescription de traitement rapide.

- L'infection par instillation intranasale de HSV-1 chez les jeunes animaux (6-8 semaines) entraîne rapidement un œdème oculaire, une perte de poids, des signes neurologiques et le décès par œdème cérébral. Les évaluations de l'état de santé de l'animal doivent donc être très fréquentes.
- La prédiction des signes cliniques est difficile et ceux-ci varient d'un animal à l'autre. Le caractère aigu des implications cliniques entraîne une augmentation des observations requises pour ce modèle d'infection.
- Pour toutes nouvelles lignées de souris ou changement de l'inoculum viral ou de la souche de virus normalement injectée aux animaux, seulement un petit groupe de souris doit être utilisé afin de déterminer l'inoculum viral minimal permettant d'observer les signes cliniques de la maladie tout en minimisant les effets sur le bien-être animal. La Direction des services vétérinaires doit être avisée avant le début de l'expérimentation.
- Comme ce modèle demande des suivis fréquents et une bonne connaissance des signes cliniques associés, seules les personnes dûment formées et expérimentées avec ce modèle peuvent effectuer une expérimentation. Toute nouvelle personne appelée à utiliser ce modèle invasif doit être accompagnée par le personnel de soins de l'animalerie où se déroule le protocole ainsi qu'un membre de l'équipe de recherche qui possède de l'expérience.
- Le taux de mortalité et le taux de morbidité attendus lorsque connus doivent être indiqués dans le protocole soumis et approuvé par le CPAUL. Ces taux doivent être connus par les utilisateurs d'animaux et tout écart doit être signifié à un vétérinaire de la DSV.

Procédure

Les procédures doivent être réalisées dans un laboratoire de niveau de confinement approprié en fonction des recommandations faites à la suite de l'évaluation par le comité des risques biologiques. Un permis des risques biologiques doit être délivré pour connaître le niveau de confinement attendu.

Acclimatation

- Utiliser des souris d'âge suivant selon la lignée :
 - Souris C57BL/6 âgées de 6 à 8 semaines (similaire pour les souris knockout);
 - Souris BALB/c âgées de 5 à 7 semaines;
- Offrir une période d'acclimatation de 3 jours à la nourriture humide et au DietGel® Boost avant l'infection.
- Fournir aux animaux une cachette permettant le maintien de la thermorégulation.

Préparation de la suspension virale

- Préparer la suspension virale à l'inoculum désiré en diluant avec un volume de milieu de culture (minimal essential medium; MEM) de manière aseptique sous une enceinte de sécurité biologique. Les souris non infectées recevront 20 µl de MEM stérile par voie intranasale.
- Préparer un volume de suspension virale pour l'ensemble des souris (20 µL/souris) en prévoyant un volume additionnel de 20%. Préparer un tube contenant le volume nécessaire de MEM pour administrer aux souris non infectées.
- Conserver la suspension virale et le MEM stérile sur glace jusqu'à l'administration aux animaux.

Infection de l'animal avec le HSV-1

- Peser l'animal.
- Tranquilliser l'animal avec de l'isoflurane selon la PNF A-1 Anesthésie et analgésie des rongeurs.
- Identifier la souris en poinçonnant l'oreille.
- Bien mélanger la suspension virale avant son administration pour l'homogénéiser.
- Après une contention appropriée, maintenir l'animal incliné vers l'arrière avec un angle d'environ 30°. Administrer par voie intranasale la suspension virale dans un volume de 20 µl en respectant la PNF AD-2 Administrations et injections chez la souris, et en alternant les narines utilisées lors des inspirations.
 - 6×10^5 unités formatrices de plaques/ml (souris C57BL/6)
 - 1.5×10^3 unités formatrices de plaques/ml (souris BALB/c)

Suivi des animaux

- Peser les animaux quotidiennement jusqu'à la fin du protocole.
- Offrir aux animaux de la nourriture humide et du DietGel® Boost quotidiennement jusqu'à la fin du protocole.
- Prévoir en tout temps le matériel pour une euthanasie d'urgence. Aucun délai ne sera toléré lors de l'atteinte des points limites.
- Vérifier l'état des animaux selon les fréquences suivantes afin qu'un délai suffisant soit respecté entre les observations et noter les signes cliniques dans le formulaire prévu à cet effet.

Animaux	J0 à J4	J5 à J7	J7 et +
Lignées résistantes (ex. C57BL/6 sauvages) ou modérément sensibles au HSV-1	<p>Une observation (OB) par jour: OB + pesée 7h30-8h00</p> <p>Si début de signes cliniques même légers OB #2 : 17h00-17h30</p>	<p>Trois observations par jour</p> <p>OB #1 + pesée: 7h30-8h00 OB #2 : 12h00-12h30 OB #3 : 18h00-18h30</p>	<p>Une observation par jour : OB + pesée : 7h30-8h00</p> <p>Si poursuite de signes cliniques même légers OB #2 : 17h00-17h30</p>
Nouvelles lignées/nouvelles souches virales/ lignées très sensibles au HSV-1 (ex. BALB/c)	<p>Deux observations par jour</p> <p>OB # 1 : 7h30-8h00 OB # 2 : 17h00-17h30</p>		

Points limites

Le terme « point limite scientifique » décrit l'indicateur le plus précoce qui permet de réaliser les objectifs énoncés pour une activité scientifique.

- Euthanasier l'animal :
 - en respect de la PNF ETH-10a Points limites – rongeurs pour toutes autres conditions non spécifiques au modèle;
 - un score de 2 sur l'[échelle d'évaluation des expressions faciales des souris](#);
 - respiration rapide et abdominale;
 - lorsqu'un animal après addition des pointages se situe dans une atteinte modérée à sévère :
 - Modérée : pointage de 2 dans trois catégories différentes;
 - Sévère : pointage de 2 dans **toutes** les catégories OU pointage de 3 dans l'une des catégories suivantes.

Activité de l'animal

Conditions	Pointage	Action
Activité normale, déplacements rapides et nombreux, animal normalement dans le nid en période diurne	0	Aucune
Diminution légère de l'activité, déplacements rapides, mais diminués en nombre, animal normalement dans le nid en période diurne	1	Aucune
Diminution modérée de l'activité, déplacements encore présents, mais diminués en vitesse et en nombre, animal normalement dans le nid en période diurne	2	Augmentation de la fréquence d'observation Vérification de l'état d'hydratation ¹
Inactivité complète, animal isolé et en dehors du nid	3	Euthanasie

¹ Administrer 1 ml de lactate de Ringer par voie sous-cutanée lors de déshydratation.

État du pelage

Conditions	Pointage	Action
Pelage complètement lisse, non ébouriffé et luisant	0	Aucune
Pelage légèrement ébouriffé et/ou terne	1	Aucune
Diminution marquée du toilettage et/ou apparence terne du pelage ne pouvant être associées au vieillissement de l'animal	2	Augmentation de la fréquence d'observation Vérification de l'état d'hydratation ¹
Pelage très ébouriffé	3	Euthanasie

¹ Administrer 1 ml de lactate de Ringer par voie sous-cutanée lors de déshydratation.

Symptômes neurologiques et posture

Conditions	Pointage	Action
Aucun signe Posture normale	0	Aucune
Agitation Posture légèrement modifiée, pas de déplacement sur la pointe des orteils	1	Aucune
Signes neurologiques légers : tendance à pencher légèrement sur le côté Posture modérément modifiée, déplacement sur la pointe des orteils	2	Augmentation de la fréquence d'observation Euthanasie si pointage de 2 lors de 2 observations consécutives OU lors de l'observation du soir Vérification de l'état d'hydratation ¹
Signes neurologiques sévères : convulsions, tremblements, tête penchée et/ou décubitus latéral incomplet ou complet, tournis, démarche anormale (reculons, sautillement, etc.) Dos voûté, déplacement sur la pointe des orteils	3	Euthanasie

Perte de poids

Conditions	Pointage	Action
Poids sans variation, comparable à un animal contrôle en croissance	0	Aucune
Perte de poids 1 à 14 % avec état de chair $\geq 2/5$	1	Vérification de l'état d'hydratation ¹
Perte de poids 15-19 % avec état de chair $\geq 2/5$	2	Ajouter du DietGel Boost® et de la nourriture humide plus fréquemment si consommés en totalité Vérification de l'état d'hydratation ¹
Perte ≥ 20 % avec état de chair $\leq 2/5$ avec ou sans signes cliniques associés ou un état de chair de 1/5	3	Euthanasie

¹ Administrer 1 ml de lactate de Ringer par voie sous-cutanée lors de déshydratation.

Le « point d'intervention éthique » décrit les signes (c'est-à-dire des effets observables sur la santé, des modifications physiologiques, des manifestations comportementales) qui, lorsqu'ils sont présents, exigent d'intervenir pour le bien-être des animaux. Les traitements doivent être effectués par le personnel de soins de l'animalerie comme prescription vétérinaire.

- Contacter un vétérinaire de la DSV en cas de :
 - Lésion(s) faciale(s) ou périoculaire(s) sans ulcère cornéen;
 - Yeux mi-clos en l'absence de signes cliniques;
 - Taux de mortalité ou morbidité supérieurs aux pourcentages connus;
 - Tout autre problème de santé non relié au modèle.
- Euthanasier l'animal si :
 - Ulcère cornéen;
 - Lésion(s) faciale(s) de plus de 30 % ou périoculaires extensives après discussion avec vétérinaire.

Références

Hankenson FC, Ruskoski N, van Saun M, Ying GS, Oh J, Fraser NW (2013) Weight loss and reduced body temperature determine humane endpoints in a mouse model of ocular herpesvirus infection. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 52:277–285.

Hawkins P, Morton DB, Burman O, Dennison N, Honess P, Jennings M, Lane S, Middleton V, Roughan JV, Wells S, Westwood K, UK Joint Working Group on Refinement BVA/AFW/FRAME/RSPCA/ UFAW (2011) A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVA/AFW/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group.

J. Sehl, et al., An improved animal model for herpesvirus encephalitis in humans, [PLOS Pathog.](#) 2020 Mar; 16(3): e1008445.

Kollias Christina M. et al., Animal models of herpes simplex virus immunity and pathogenesis, *J. Neurovirol.* (2015) 21:8–23 DOI 10.1007/s13365-014-0302-2.

Toth LA (2000) Defining the moribund condition as an experimental endpoint for animal research. *ILAR J* 41:72–79.