



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 des membres 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
Modifiée par Katerine Matte <i>Technicienne en santé animale, Direction des services vétérinaires</i>	Date : 22 septembre 2023
Révisée par : Anne-Marie Catudal et Isabelle Côté <i>Vétérinaires cliniciennes, Direction des services vétérinaires</i> Louis-Charles Béland <i>Professionnel de recherche, laboratoire Luc Vallières</i> Jocelyne Piret <i>Cheffe de projets, laboratoire Guy Boivin</i>	Date : 22 septembre 2023
Approuvée par : CPAUL-3	Date : 14 novembre 2023
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 2

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 qui établit un état latent, généralement dans les ganglions du trijumeau, suivi de réactivations périodiques.
- L'instillation intranasale du virus herpès simplex chez la souris 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, comme l'injection intracérébrale, cependant, ces différentes techniques nécessitent une dérogation.
- Les souris C57BL/6 sont considérées comme étant plus résistantes à l'infection. Les souris BALB/c ainsi que les jeunes souris sont davantage sensibles. Les souris déficientes en immunité innée pourraient l'être aussi.
- La période critique pour le développement des signes cliniques se situe normalement entre les jours 4 et 7 post-infection. La fréquence d'observation au cours de cette période critique doit être augmentée.

- Des lésions faciales peuvent être observées lors de l'instillation intranasale de HSV-1. Des ulcères cornéens sont aussi possibles. Il est essentiel de surveiller les signes d'atteintes faciales et oculaires à l'aide du formulaire de suivi en annexe 1.
- L'infection par instillation intranasale de HSV-1 chez les jeunes animaux (6-8 semaines) entraîne rapidement un œdème oculaire, une perte de poids importante, 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 de la sévérité des signes cliniques est difficile et ceux-ci varient d'un animal à l'autre.
- La DSV doit être avisée avant le début de l'expérimentation lorsque de nouveaux paramètres pouvant affecter les signes de la maladie chez les souris sont utilisés, par exemple, l'infection de nouvelles lignées, l'injection d'un inoculum viral ou l'utilisation d'une souche de virus différente. Dans ces cas, un petit groupe de souris doit être utilisé au préalable 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.
- 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 doit être accompagnée par le personnel de soins de l'animalerie où se déroule le protocole ou par un membre de l'équipe de recherche qui possède de l'expérience.
- Lorsque connus, le taux de mortalité et le taux de morbidité attendus doivent être indiqués dans le protocole soumis et approuvé par le CPAUL. Ces taux doivent être connus par les personnes qui travaillent avec ces animaux et tout écart doit être communiqué 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 le 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.
 - 6×10^5 unités formatrices de plaques/ml (souris C57BL/6)
 - 1.5×10^3 unités formatrices de plaques/ml (souris BALB/c)
- 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

- Privilégier l'infection des animaux le vendredi, afin que la période critique coïncide avec l'horaire de travail régulier du personnel technique en santé animale (TSA).
- Peser l'animal.
- Anesthésier 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 20 µL de suspension virale en respectant la PNF AD-2 Administrations et injections chez la souris, et en alternant les narines utilisées lors des inspirations.
- Pour réduire le risque de plaies faciales, il est fortement recommandé de couper les griffes des animaux, idéalement pendant qu'ils sont encore sous sédation.

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.

- Lorsque possible, la première évaluation quotidienne par l'équipe de recherche devrait être réalisée en même temps que l'observation du personnel technique en santé animale TSA pour diminuer le nombre de manipulations.
- Vérifier l'état des animaux selon les fréquences du tableau 1 afin qu'un délai suffisant soit respecté entre les observations et noter les signes cliniques dans le formulaire prévu à cet effet (voir annexe 1).

Tableau 1 : Fréquence d'observation des animaux

Animaux	J0 à J4	J5 à J7	J8 et +
Lignées résistantes (ex. C57BL/6 sauvages) ou modérément sensibles au HSV-1	Une observation (OB) par jour OB + pesée : 7h30-8h00 Si début de signes cliniques même légers OB #2 : 17h00-17h30	Trois observations par jour OB #1 + pesée : 7h30-8h00 OB #2 : 12h00-12h30 OB #3 : 18h00-18h30	Une observation par jour OB + pesée : 7h30-8h00 Si poursuite de signes cliniques même légers OB #2 : 17h00-17h30
Nouvelles lignées/ nouvelles souches virales/ lignées très sensibles au HSV-1 (ex. BALB/c)	Deux observations par jour OB # 1 : 7h30-8h00 OB # 2 : 17h00-17h30		

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 pour un maximum de trois observations par jour 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, selon la fréquence recommandée par le TSA.

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, selon la fréquence recommandée par le TSA.

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, sauttillement, etc.) Dos voûté, déplacement sur la pointe des orteils	3	Euthanasie

¹ Administrer 1 ml de lactate de Ringer par voie sous-cutanée lors de déshydratation, selon la fréquence recommandée par le TSA.

Perte de poids

Conditions	Pointage	Action
Poids sans variation, comparable à un animal contrôle en croissance	0	Aucune
Perte de poids 1 à 14,9 % avec état de chair \geq 2/5	1	Vérification de l'état d'hydratation ¹
Perte de poids 15-19,9 % avec état de chair \geq 2/5 OU Perte de poids \geq 20 % avec état de chair $>$ 2/5	2	Ajout du DietGel® Boost et de la nourriture humide Vérification de l'état d'hydratation ¹
Perte de poids \geq 20 % avec état de chair \leq 2/5 avec ou sans signes cliniques associés OU Perte de poids de 25 % et plus OU État de chair de 1/5	3	Euthanasie

¹ Administrer 1 ml de lactate de Ringer par voie sous-cutanée lors de déshydratation, selon la fréquence recommandée par le TSA.

Points limites scientifiques

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;
 - À l'atteinte d'un score de 2 sur l'[échelle d'évaluation des expressions faciales des souris](#);
 - Si 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
 - État du pelage
 - Symptômes neurologiques et posture
 - Perte de poids

Points d'intervention éthique

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.

- Dès qu'un œil mi-clos est observé, effectuer un examen quotidien pour détecter toute lésion oculaire.
Note : Cet examen quotidien doit être effectué par les TSA de l'animalerie.
- Contacter un vétérinaire de la DSV en cas de :
 - Lésion(s) faciale(s) ou périoculaire(s) sans ulcère cornéen;
 - Taux de mortalité ou morbidité supérieurs aux pourcentages attendus;
 - Tout autre problème de santé non relié au modèle.
Note : La fréquence d'observation doit être augmentée. Les traitements prescrits pour ces conditions doivent être appliqués par les TSA de l'animalerie.
- Euthanasier l'animal si :
 - Ulcère cornéen;
 - Lésion(s) faciale(s) de plus de 30 % ou périoculaire(s) extensive(s) 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.

Mises à jour de la PNF		
Version 2	2023	Raffinement global de la procédure, entre autres points d'intervention éthique. Ajout de l'annexe 1.

Annexe 1 : Formulaire de suivi - Encéphalite herpétique (HSV-1)



SUIVI MODÈLES LONGITUDINAUX - Encéphalite herpétique (HSV-1)

Cage # _____

Chercheur :			Protocole :		Date d'infection :			Responsable :		
ID	Poids	Observations et traitements	J__ Date / Init.	J__ Date / Init.	J__ Date / Init.	J__ Date / Init.	J__ Date / Init.	J__ Date / Init.	J__ Date / Init.	J__ Date / Init.
	PD:	Période d'observation								
		Poids (g)								
		% poids gain / perte								
		État de chair (/5)								
		Observation œil gauche **								
		Observation œil droit **								
	PD - 15%:	Observation museau ***								
		Pointage Activité								
		Pointage Pelage								
		Pointage Neurologique								
	PD - 20%:	Pointage Poids								
		Déshydratation								
		Lactate de Ringer* 1ml (v)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		Observations anormales								
Avis vétérinaire/Tx										
	Nourriture humide, Boost (v)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	PD:	Période d'observation								
		Poids (g)								
		% poids gain / perte								
		État de chair (/5)								
		Observation œil gauche **								
		Observation œil droit **								
	PD - 15%:	Observation museau ***								
		Pointage Activité								
		Pointage Pelage								
		Pointage Neurologique								
	PD - 20%:	Pointage Poids								
		Déshydratation								
		Lactate de Ringer* 1ml (v)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		Observations anormales								
Avis vétérinaire/Tx										
	Nourriture humide, Boost (v)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Légende: *Fréquence d'administration du lactate selon le niveau de déshydratation déterminé par un TSA: Légère=SID, Modérée=BID, Sévère=TID // ** Inscire un choix suivant : RAS, opacité, mi-clos, clos, ulcère // *** Inscire un choix suivant: RAS, Légèrement bombé, bombé//

Les versions Excel et PDF sont disponibles en ligne sous l'onglet modèle : [Formulaires | Direction des services vétérinaires \(ulaval.ca\)](http://ulaval.ca/direction-des-services-veterinaires/formulaires)