



Noroit accompagne le Centre de Recherche (CDR) Saint- Antoine dans la plateforme de phénotypage du petit animal.



Du matériel simple et autonome, qui protège le manipulateur tout en évitant les croisements de transgènes dans le laboratoire de génotypage, c'est la clef du fonctionnement optimal de la PHEA et du service de génotypage associé (LG) du CdR Saint-Antoine. Noroit a installé une hotte de PCR Lys et a configuré la salle ISO de la plateforme de zootechnie du CdR.

Le fonctionnement du laboratoire « génotypage » à Saint-Antoine

Le laboratoire de génotypage¹, piloté par Delphine Muller et la PHEA pilotée par Tatiana Ledent sont prestataires de services pour les chercheurs de l'hôpital et aussi ceux de l'extérieur (la faculté Saint Antoine, l'hôpital Trousseau, le centre universitaire des Saints Pères). En pratique, les équipes sollicitent le service pour rapatrier dans l'animalerie EOPS (exempte d'organismes pathogènes spécifiques) un ou plusieurs modèles de souris transgénique répondant à leur problématique scientifique. Pour cela, ils vont faire venir trois ou quatre souris mâles «fondateurs ». Jusqu'à l'ouverture de la zone conventionnelle, tout animal doit être décontaminé par transfert d'embryons avant d'entrer dans la PHEA.

La PHEA, qui est une zone EOPS va mettre au point un plan d'élevage afin d'amplifier la cohorte animale et obtenir le nombre d'animaux avec le génome d'intérêt pour chaque projet d'étude des équipes de recherche.

Le peu de personnel (4 zootechniciens) l'oblige à regrouper les congés sur une plage temporelle réduite et à initier seulement 2 grandes phases d'accouplement : avant les vacances (d'été et d'hiver) et le sevrage après les vacances.

Une à deux semaines avant la fin du sevrage, le laboratoire de génotypage reçoit les bouts de queue des souris et effectue les examens sur PCR². Mme Muller travaille sous une hotte de PCR pour éviter la contamination des prélèvements à amplifier.

Les résultats doivent être donnés dans les quinze jours (à raison de 100 à 300 échantillons par semaine) alors que tout arrive en même temps. En effet, tous les élevages et toutes les lignées à génotyper sont livrés sur trois à huit semaines maximum.

¹ Le génotypage est la discipline qui vise à déterminer l'identité d'une variation génétique, à une position spécifique sur tout ou partie du génome, pour un individu ou un groupe d'individus donné appartenant à une espèce animale, végétale, fongique... Il est effectué de manière standardisée et automatisée par des robots (robots de pipetage, robot extracteur d'ADN, etc.) thermocycleurs, séquenceurs capillaires.

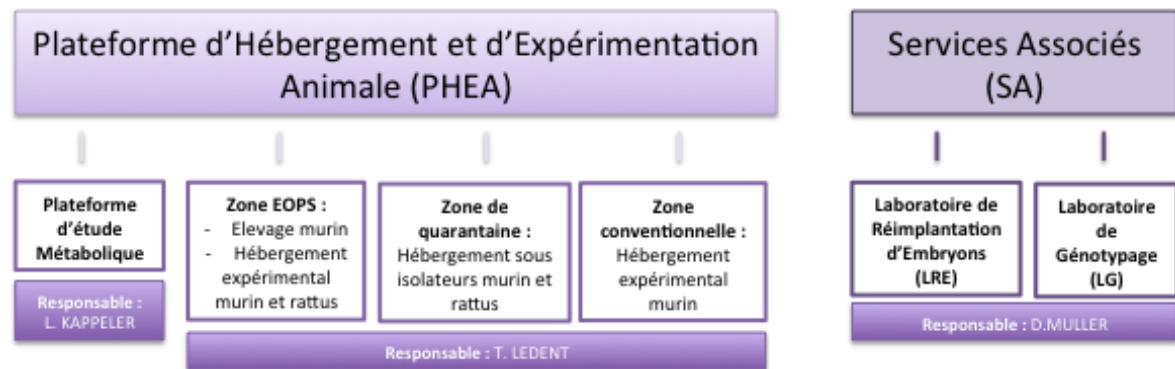
² L'amplification en chaîne par polymérase ou réaction en chaîne par polymérase (PCR est l'abréviation anglaise de polymerase chain reaction, l'acronyme français ACP étant très rarement employée) est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, qui permet de dupliquer en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard) une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité (de l'ordre de quelques picogrammes) d'acide nucléique (séquence spécifique d'ADN) et d'amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides).



Etude de cas

Lys – avril 2015

Plateforme de Phénotypage du Petit Animal du CdR St Antoine



Un système de marche en avant est instauré dans le laboratoire de biologie moléculaire. Souvent, c'est en ligne, mais dans ce laboratoire, la salle est en U. Chaque opération est organisée de manière à ce qu'aucun croisement ne puisse troubler l'analyse et risquer la contamination des échantillons à amplifier.

Tout ce qui est lyse des tissus par la protéinase K et extraction de l'ADN se fait sur la paillasse en début de process. Le mix PCR s'effectue sur la hotte de PCR, placée au fond de la salle. Des thermocycleurs³ sont utilisés ensuite. Le dépôt sur gel d'agarose⁴ est effectué pour visualiser l'ADN amplifié. En fin de circuit, les comptes-rendus et résultats sont rédigés sur le bureau près de la porte.

Avec 75 lignées murines hébergées dans la PHEA, dont 15 génotypées en routine par le LG, ce sont au minimum 90 échantillons par lignée par semaine qui arrivent. C'est aléatoire, selon la période de reproduction de l'animal. L'extraction d'ADN est effectuée le lundi, en une seule étape de lyse par la protéinase K sur la nuit. La PCR est lancée le mardi sur des plaques de 96 puits, à raison de deux plaques le matin et deux plaques l'après-midi par exemple. Le mercredi et le jeudi, les plaques sont déposées sur gels d'agarose et le vendredi les résultats sont récupérés, interprétés et envoyés aux équipes concernées.



Logiquement, Mme Muller ne pratique la PCR que sur une seule lignée par jour pour éviter les croisements. Mais parfois, si les lignées à génotyper sont trop nombreuses ou les protocoles sont différents (par exemple une prédigestion enzymatique à faire), alors un problème se pose. Dans ce cas, afin de limiter les risques de contamination d'échantillons non amplifiés par des amplicons⁵, les PCR du mardi matin sont remplacées par la seconde étape d'extraction ADN et reportées au mercredi matin. Dans ces contraintes d'espace et de temps, la réalisation de mix PCR sous hotte (Lys –Noroit) prend tout son sens afin de garantir la fiabilité des génotypes obtenus. De même, toute étape enzymatique à réaliser sur produit de PCR (amplicon) doit se faire une fois toutes les extractions de la semaine terminées et en prenant soin de préserver la hotte où sont réalisés les mix PCR.

³ Le thermocycleur (auss appelé cycleur thermique ou machine PCR) est un appareil automatisant la réaction de PCR « classique » ou « point final ».

⁴ L'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer l'ADN, l'ARN ou des protéines en fonction de leur poids moléculaire. La technique de l'électrophorèse en gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose : les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

⁵ Un amplicon est un fragment d'ADN amplifié par PCR



Delphine Muller fait intervenir les zootechniciens dans son laboratoire pour la dépose sur gel d'agarose. La lecture des gènes, qui est très visuelle, leur parle. Le mix PCR est encore abstrait pour eux. Certains zootechniciens n'ayant pas de formation biologique, ils élèvent des souris transgéniques sans savoir comment cela fonctionne. Le travail sur échantillon d'ADN (invisible à l'œil nu), est pour eux quelque chose de virtuel. Il est donc important de prendre toutes les précautions possible afin d'éviter les contaminations des échantillons dues à des maladresses de manipulation.

Le fonctionnement des thermocycleurs est expliqué pour faciliter l'utilisation, selon la lignée à étudier.

Le matériel simple permet de diminuer les risques d'erreur, d'éviter les pannes, donc les réparations, donc les surcoûts et la perte de temps. Pour des utilisateurs qui ne parlent pas du tout anglais, il faut du matériel affichant des messages en français.

Le dossier « plateforme zootechnie » avec Noroit

En 2009, Mme Muller était recrutée par le CdR de l'hôpital Saint-Antoine. Après une expérience de technicienne P3, puis un diplôme d'ingénieur et de biologie moléculaire, elle a été chargée du projet d'aménagement de l'animalerie.

Avec sa collaboratrice, Mme Ledent, elle a mis en place un projet de plateforme de phénotypage, jeté les premiers plans sur le papier, est allée à la rencontre des acteurs de l'animalerie à l'AFSTAL⁶.

Une première enveloppe financière avait été définie en 2003 sur la base d'une plateforme de zootechnie traditionnelle. Par la suite, le CdR a été formé en 2008 et a accueilli une équipe travaillant sur l'immunologie. Il s'est alors avéré indispensable d'investir dans une zone d'élevage et d'expérimentation au statut sanitaire propre et dans une salle équipée d'isolateurs, ce qui n'avait pas été budgété en 2003.

Tout en démarchant les prestataires de service, Mme Muller a tenté d'obtenir des financements supplémentaires dès 2010. Un premier prestataire avait été référencé mais le budget était trop lourd et le manque de flexibilité face aux aléas budgétaires et immobiliers avaient mené à une impasse. Une autre visite à l'AFSTAL a permis à Mme Muller de rencontrer Noroit et de discuter du projet d'animalerie. « Cela nous allait très bien, le produit était bien. Nous avons une vraie discussion, à bâtons rompus, avec des propositions capables de s'adapter en cas de coupure budgétaire et d'impondérable lors des travaux immobiliers. Nous avons pu mettre en place plusieurs scénarii répondant à l'ensemble de nos besoins. De plus, le SAV était plus intéressant qu'avec l'autre prestataire, moins éloigné de Paris et donc avec plus de réactivité. »

En 2011, Mme Muller obtint un financement pour l'achèvement de la Plateforme de Phénotypage. Bien que ces financements fussent répartis entre 2012 et 2014, et qu'une partie plus importante qu'initialement prévue ait dû être reversée à l'installation de la Plateforme d'étude du Métabolisme, le projet a vu le jour en 2012 avec plusieurs appels d'offres passés entre 2012 et 2014.

Noroit, qui a répondu à ces appels d'offres avec réactivité et flexibilité, avait un « tarif quasiment sans équivoque, étant moins cher que les autres prestataires ».

Et puis, avec Noroit s'est installée une relation de confiance. « On peut échanger, on peut leur parler. Ils nous conseillent, nous font un retour sur nos propositions. Ils nous prennent au sérieux même si au début, on ne s'y connaissait pas. »

⁶ Le colloque des acteurs des sciences de l'animal de laboratoire : le 41^e colloque de l'association AFSTAL s'est tenu du 3 au 5 juin 2015 à Lille sur le thème "Biosécurité et Infectiologie".



Pour le Laboratoire de Génotypage (LG) :



La société Noroit a répondu à un besoin précis, là où on ne l'attendait pas. « Bien que cette demande ne fasse pas partie intégrante du scénario original composé essentiellement d'isolateur et de PSM de travail pour milieu confiné, ils ont su répondre à notre besoin avec exactitude », précise Mme Muller.

La hotte de PCR Lys de Noroit (900 mm de largeur) installée en 2012 s'adapte tout à fait à l'espace réduit qui lui est réservé. Fermée, elle est facile à décontaminer⁷. Le nettoyage est très facile à mettre en œuvre avec les UV. Ceux-ci sont lancés tous les soirs et fonctionnent bien. Cette opération quotidienne est nécessaire dans la mesure où une lignée est étudiée quotidiennement, cela évite les croisements inter-lignées (cf les transgènes parfois très proches). La hotte de PCR Lys est allumée toute la journée le mardi. Parfois aussi, le laboratoire tourne pour une PCR en urgence.

Pour la zone EOPS :

Tout a débuté en 2010 par l'installation d'un sas de transfert d'animaux Intégré au sous-sol, avec une spécificité Noroit de brancher le diffuseur H₂O₂ directement dans la chambre du sas.

Outre cette installation, le CdR a investi en 2014 dans une hotte à binoculaire Bin-Box pour la pièce de chirurgie EOPS, le service de Mme Ledent.

Dans la nouvelle zone de quarantaine de la PHEA⁸ et le Laboratoire de Réimplantation d'Embryon attendant :

En 2013 ont été commandés deux isolateurs I-Box Zoo et une chapelle (dans une salle proche de la salle de zootechnie) ainsi qu'un poste de sécurité microbiologique de type II Solis (dans la salle dédiée à la transplantation du LRE). Ces équipements, dont l'installation s'est terminée courant 2014, sont aussi en attente d'être utilisés de manière intensive. Les différents matériels Noroit présents à l'hôpital Saint-Antoine sont tous autonomes, c'était un choix évident pour le CdR. Les statuts sanitaires sont très différents d'un service à l'autre. Il y a d'ailleurs un sas entre chaque pièce.



Quant à l'installation ou au suivi du dossier par les techniciens de Noroit, « ça se passe en confiance, c'est très bien ! ». Le laboratoire est en ordre de marche et la nouvelle plateforme de zootechnie va se monter : « c'est grâce à eux ! ».

⁷ Mme Muller utilise du DNA AWAY® spray (Thermo Scientific) quand il y a des problèmes de contamination et du PHAGONEUTRE DD (Phagogene) en routine.

⁸ Voir paragraphe « les projets du CdR ».



Les projets du CdR



Le Centre de Recherche Saint-Antoine a souhaité accorder le plus de mètres carrés à l'hébergement animal. Les espaces de travail sont réduits au minimum.

Pour poursuivre les études, le CdR a souhaité se doter au septième étage d'une nouvelle salle de zootechnie conventionnelle « sale » (c'est-à-dire recevant des animaux sales, contaminés avec des virus ou des pathogènes murins), reliée à une zone de quarantaine dite « ISO » (équipée de deux isolateurs et d'une chapelle pour le transfert des cages) et à la salle de réimplantation (équipée d'un PSM de type II et d'un incubateur), pour pouvoir réintégrer les animaux propres dans la plateforme de zootechnie du sous-sol.

Le CdR pourra ainsi faire des échanges avec d'autres universités ou selon des programmes de recherche spécifiques⁹ et proposer des études pilotes en leur apportant la POC (proof of concept). Une piste de travail serait par exemple de travailler sur des animaux contaminés dans la zone sale avant d'implanter un embryon dans une femelle pseudo-gestante propre dans la zone propre EOPS, pour obtenir ainsi un bébé souris propre. Les isolateurs de la zone du 7^e étage prépareront les animaux propres à intégrer la plateforme EOPS de zootechnie du sous-sol pour poursuivre l'élevage.

Ensuite, selon les résultats obtenus, les chercheurs pourront publier leurs résultats scientifiques et lancer l'étude sur un échantillon sélectionné et parlant pour le programme de recherche. Le laboratoire de génotypage risque d'être surchargé de travail même si les recherches menées en zone conventionnelle ne deviendront pas toujours la première étape avant l'élevage dans la plateforme EOPS.

Mme Muller espère qu'à ce moment-là le CdR aura géré la problématique des ressources humaines, en intégrant à l'équipe plus de zootechniciens pour la seconder dans ses missions. Déjà, intégrer ce personnel dans la démarche de recherche était un vrai plus pour les motiver, leur faire découvrir d'autres environnements dans la chaîne de recherche en animalerie et les faire sortir tout simplement du microcosme qu'est la zootechnie. Les TMS¹⁰ sur ces populations sont bien identifiés (poignet, genou, dos) et il est important de limiter les risques médicaux et de motiver les hommes sur d'autres tâches.

Concernant les pistes d'amélioration pour Noroit, Mme Muller propose juste d'équiper les techniciens de chariots élévateurs pour pallier les difficultés d'accès aux locaux dans les établissements comme Saint-Antoine. C'est en effet parfois compliqué de livrer les matériels en fonction de son encombrement et de la disponibilité des ascenseurs dans les vieux bâtiments parisiens !

Un élément qui est déjà inscrit dans les projets d'évolution du PSM Solis est l'option de piètement réglable, comme sur la hotte de change Esolis, pour permettre au zootechnicien de manipuler les animaux tout en restant debout.

A Saint-Antoine, Noroit est bien accueilli, fort de sa souplesse et de sa réactivité !

⁹ Pour information, les statuts sanitaires sont différents d'un pays à l'autre et les recherches ne portent pas sur les mêmes thématiques. La France se base sur le FELASA qui est un référentiel européen. Les autres continents ont d'autres listes (par exemples, les USA ne font pas de bactériologie, le Japon est spécialisé sur le viral et la parasitose, tandis que la France travaille beaucoup sur l'immunologie).

¹⁰ Troubles musculo-squelettiques



A propos de Noroit :

Noroit conçoit, fabrique et commercialise des appareils de protection contre les risques de contamination biologique, principalement dans le domaine de la santé.

Créée en 2006, Noroit propose une gamme complète d'appareils, fabriqués selon des procédures de qualité strictes et entièrement produits en France :

Protection de la manipulation	Hottes à flux laminaire horizontal ou vertical, Hottes de PCR, Plafonds soufflants, Armoires d'animalerie,
Protection du manipulateur	Postes de sécurité microbiologique, Postes de sécurité microbiologique pour zootechnie, Hottes pour robots ou cytomètres de flux, Hottes pour microscopes ou binoculaires, Hottes de change,
Confinement absolu	Isolateurs pour applications pharmaceutiques et hospitalières, Isolateurs pour zootechnie,

Pour plus d'information :

Noroit - 13, rue des Coteaux de Grandlieu - 44830 BOUAYE

Tél. : 02.40.50.12.77 - Fax : 02.40.65.35.21

contact@noroitlabo.com

www.noroitlabo.com

Contact presse : Béatrice Nourry – Tel 06 98 63 85 48 - bnourry@concordanceconseil.fr