

CHAPITRE 4.10.

COLLECTE ET MANIPULATION DES OVULES/EMBRYONS DE RONGEURS ET DE LAPINS DE LABORATOIRE

Article 4.10.1.

Statut microbien des colonies d'animaux de laboratoire

Les colonies composées de diverses espèces et génotypes d'*animaux* de laboratoire sont habituellement entretenues dans des locaux spécialisés où leur statut microbien dépend principalement du milieu autour duquel la colonie a été formée, et est entretenue. Dans le présent chapitre, le statut microbien des colonies est subdivisé en trois types principaux : « à flore définie », « ordinaire » et à statut indéfini ». Les colonies dont le statut est défini sont celles dont, au moins à l'origine, les *animaux* sont protégés aussi bien des germes pathogènes que des germes non pathogènes (*animaux* gnotobiotiques), bien qu'il arrive qu'un ensemble de germes connus, non pathogènes, leur ait été administré ultérieurement. Dans ces deux cas, les colonies définies sont maintenues dans un environnement rigoureusement surveillé dans des enceintes fermées, aux termes de protocoles stricts visant à exclure toutes sources potentielles de contamination microbienne indésirable. Les colonies dont le statut est dit ordinaire sont composées d'*animaux* maintenus dans une enceinte fermée mais dans laquelle des agents pathogènes connus (« spécifiques »), ainsi que des germes non pathogènes, sont susceptibles d'exister. Alors que les protocoles de gestion des colonies ordinaires peuvent être moins stricts que dans le cas des colonies à flore définie, ils visent néanmoins à contrôler les sources potentielles de contamination microbienne. Le recours à de simples précautions d'asepsie (telles que l'autoclavage des aliments et des litières) devrait permettre de maintenir les *animaux* dans une ambiance microbienne définie. Les *animaux* de laboratoire peuvent aussi se trouver dans des milieux dont le statut microbien n'est pas défini : colonies non isolées, *animaux* élevés en liberté. De plus amples informations sur ces différents types de colonies peuvent être obtenues dans le Rapport de la FELASA¹.

L'état sanitaire des colonies de statut défini et ordinaire doit être contrôlé au moins trimestriellement par des épreuves bactériologiques, virologiques, parasitologiques, sérologiques et autres pratiquées sur des *animaux* sentinelles préalablement sélectionnés à cet effet ou sur d'autres *animaux* représentatifs de la colonie. Les mâles reproducteurs âgés dont sont issues plusieurs portées sont souvent sélectionnés à cet effet.

L'objectif d'un contrôle sanitaire officiel des embryons de rongeurs et de lapins de laboratoire destinés à être distribués internationalement est d'assurer le contrôle des germes pathogènes spécifiques qui peuvent être associés à ces embryons, et d'éviter la transmission d'*infections* aux *animaux* receveurs, à leur descendance et aux colonies auxquelles ils appartiennent. Les obligations applicables à la gestion des femelles donneuses et à la manipulation des embryons sont variables selon le statut microbien de la colonie, selon qu'il s'agit d'une colonie définie (notamment gnotobiotique), ordinaire ou indéfinie.

Article 4.10.2.

Conditions applicables à l'équipe de collecte d'embryons

L'équipe de collecte d'embryons est un groupe de techniciens qualifiés pour procéder aux opérations de collecte, de manipulation et d'entreposage des ovocytes et des embryons. Elle comprend au minimum un professionnel justifiant d'un niveau d'expérience.

Les conditions énoncées ci-dessous doivent être respectées :

1. L'équipe doit être placée sous la supervision directe d'un professionnel justifiant d'un niveau d'expérience.
2. Le professionnel expérimenté de l'équipe est responsable de toutes les activités de l'équipe, notamment de celles concernant la vérification du statut microbien de la colonie et de l'état sanitaire des *animaux* donneurs et le respect des conditions sanitaires lors des opérations de manipulation et des soins chirurgicaux, et des procédures de *désinfection* et d'hygiène. Le professionnel expérimenté de l'équipe doit être placé sous la surveillance générale du *vétérinaire* de l'institut.
3. Le *vétérinaire* de l'institut doit être titulaire d'un certificat ou d'un agrément pour prodiguer des soins aux *animaux* de laboratoire et doit être spécialement habilité à conduire des opérations sur des embryons destinés aux échanges internationaux. La responsabilité de veiller à ce que les protocoles de mise en conformité sanitaire propres aux colonies soient effectivement appliqués incombe au *vétérinaire* de l'institut. Il ou elle est responsable de la certification des procédures de manipulation des embryons et des locaux du laboratoire, conformément aux dispositions décrites dans le présent chapitre
4. Le personnel de l'équipe doit être formé de façon appropriée aux techniques et principes du contrôle des *maladies* et à l'utilisation des techniques d'asepsie pour la manipulation des embryons. La possibilité qu'ont certains agents pathogènes d'occasionner des zoonoses doit notamment être précisée et bien comprise par tous les membres du personnel afin d'éviter la contamination des colonies par des vecteurs humains (et réciproquement).
5. Des normes d'hygiène très strictes doivent être mises en place afin d'éviter la transmission de toute *infection* aux *animaux* donneurs, aux colonies, dans les locaux et par le matériel. Des dispositions doivent être prises pour empêcher le personnel d'accéder librement au site de collecte et de manipulation des embryons après l'exposition du personnel concerné à d'autres locaux réservés à la manipulation.
6. L'équipe doit disposer des locaux et des équipements nécessaires pour assurer :
 - a) la collecte des embryons ;
 - b) la manipulation et le traitement des embryons sur un site permanent ou dans un laboratoire mobile ;
 - c) l'entreposage des embryons.
7. Il appartient au *vétérinaire* de l'institut de veiller à ce que des dossiers complets sur les *animaux* et les embryons se rapportant entre autres au déroulement des opérations de collecte, de traitement et d'entreposage des embryons soient tenus. Des fiches de renseignements similaires à celles figurant dans le Manuel de l'IETS² et s'appliquant à la catégorie des *animaux* de rente doivent être utilisées le cas échéant pour la consignation d'informations telles que l'identification du génotype des donneurs, ainsi que le grade de qualité et le stade morphologique de l'embryon. L'équipe de collecte doit, au moins pendant les 2 années suivant l'exportation des embryons, tenir un registre de ses activités qui sera présenté à l'*Autorité vétérinaire* lors de tout contrôle.
8. L'équipe de collecte, si cette dernière est chargée de l'exportation des embryons, doit être agréée par l'*Autorité compétente* et se soumettre à des contrôles réguliers, de préférence annuels, pratiqués par un *vétérinaire officiel* afin d'assurer le respect des procédures relatives aux conditions sanitaires de collecte, de manipulation et d'entreposage des embryons.

Article 4.10.3.

Conditions applicables aux laboratoires de manipulation

Tout laboratoire de manipulation, utilisé par l'équipe de collecte d'embryons, est une installation dans laquelle les embryons sont recueillis sur les femelles donneuses (ou extraits de l'appareil reproducteur disséqué) et extraits de leur milieu de collecte, puis examinés et soumis à tous les traitements requis, tels que le lavage, la cryopréservation avant entreposage et la mise en quarantaine, dans l'attente des résultats des procédures de diagnostic. Un laboratoire de manipulation peut être soit une partie d'une unité conçue spécialement pour les opérations de collecte et de traitement, soit une partie d'un bâtiment existant, aménagée à cet effet. Il peut être situé sur le lieu d'entretien des femelles donneuses.

En outre :

1. Le laboratoire de manipulation doit être placé sous la surveillance directe du *vétérinaire* de l'institut et contrôlé régulièrement par un *vétérinaire officiel*.
2. Lorsque des embryons destinés à l'exportation sont manipulés avant d'être conservés en ampoules, flacons ou paillettes, aucune opération ne doit être effectuée sur des embryons de qualité sanitaire inférieure.
3. Le laboratoire de manipulation doit être construit avec des matériaux permettant un nettoyage et une *désinfection* efficaces. Ces opérations doivent être réalisées fréquemment, et toujours avant et après chaque manipulation d'embryons destinés à l'exportation.

Article 4.10.4.

Gestion du risque

Au regard de la transmission de *maladies*, le transfert d'embryons collectés *in vivo* constitue une méthode à très faible risque pour transférer du matériel génétique animal. Quelle que soit l'espèce animale considérée, il existe trois phases dans le processus de transfert d'embryons qui déterminent le niveau final de risque :

1. La première phase concerne la probabilité de risques d'une *infection* des embryons, laquelle dépend :
 - a) de la situation zoosanitaire du *pays exportateur* et/ou de la *zone* d'exportation ;
 - b) du statut microbien de la colonie (c'est-à-dire colonie à flore définie, colonie ordinaire ou colonie à statut indéfini) et de l'état sanitaire des femelles donneuses sur lesquelles les embryons sont prélevés ;
 - c) du pouvoir pathogène des agents pathogènes spécifiques dont l'*Autorité vétérinaire* du *pays importateur* cherche à se protéger.
2. La deuxième phase a trait à l'atténuation du risque grâce à l'utilisation de procédures, agréées au niveau international, de traitement des embryons qui sont définies dans le Manuel de l'IEETS². Ces procédures sont les suivantes :
 - a) En fonction du statut microbien de la colonie, les embryons doivent être lavés au moins 10 fois à une dilution d'au moins 1/100 entre chaque lavage, et une nouvelle pipette doit impérativement être utilisée pour le transfert des embryons entre chaque lavage.
 - b) Seuls des embryons provenant d'une même femelle donneuse doivent être lavés ensemble, et le nombre autorisé par lavage ne doit pas excéder dix embryons.
 - c) Lorsque des opérations d'inactivation ou d'élimination de certains virus (herpèsvirus par exemple) sont rendues nécessaires, la procédure de lavage normalisée doit être modifiée pour inclure de nouveaux lavages avec addition de trypsine, comme indiqué dans le Manuel de l'IEETS².

- d) Après le lavage, la zone pellucide de chaque embryon doit être examinée sur toute sa surface sous un grossissement d'au moins 50X et être certifiée intacte et exempte de toute matière adhérente (à l'exception de la mucine s'il s'agit d'embryons de lapins).
3. La troisième phase, qui s'applique aux *maladies* dont l'*Autorité vétérinaire* du *pays importateur* cherche à se protéger, concerne les moyens d'atténuation du risque résultant des opérations suivantes :
 - a) surveillance, après collecte, du statut microbien de la colonie d'*animaux* donneurs en se fondant sur les durées normales d'incubation des *maladies* dont il convient de se protéger afin de déterminer rétrospectivement l'état sanitaire des colonies au moment où les embryons sont stockés dans le *pays exportateur* (pour les espèces pour lesquelles une mise en conservation par congélation efficace est possible) ;
 - b) examen des fluides de collecte des embryons (rinçage) et des embryons non viables, ou d'autres prélèvements, tel que le sang, au laboratoire pour détecter la présence d'agents pathogènes spécifiques.

Article 4.10.5.

Conditions applicables au vétérinaire de l'équipe de collecte des embryons et /ou de l'institut

1. Le *vétérinaire* de l'institut a pour responsabilité de s'assurer de l'application des procédures d'examen sanitaire exigibles afin de garantir le statut microbien de la colonie (c'est-à-dire colonie à flore définie, colonie ordinaire ou colonie à statut indéfini). Le statut microbien de la colonie doit être validé par le *vétérinaire* de l'institut préalablement au déroulement de l'opération d'expédition des embryons.
2. Le *vétérinaire* est chargé de certifier que les procédures de manipulation des embryons et les conditions de travail au laboratoire ont été conduites en conformité avec les Articles 4.10.2. et 4.10.3.
3. Il est également chargé de l'application des procédures de gestion du risque décrites à l'article 4.10.4.
4. Le *vétérinaire* doit délivrer son autorisation pour toutes les expéditions d'embryons et veiller à ce que les dossiers de collecte des embryons et les documents de certification sanitaire soient correctement remplis et accompagnent les lots expédiés.

Article 4.10.6.

Conditions applicables aux donneurs des colonies animales ayant un statut microbien différent

Il convient de noter que les conditions applicables aux femelles donneuses sont variables selon le statut microbien de la colonie dont elles sont issues, à savoir selon qu'il s'agit d'une colonie à flore définie, d'une colonie ordinaire ou d'une colonie à statut indéfini.

Des *animaux* sentinelles au sein de chaque colonie à flore définie et de chaque colonie ordinaire doivent être contrôlés régulièrement par des épreuves bactériologiques, de préférence selon une fréquence mensuelle ou au minimum trimestrielle. La recherche d'agents pathogènes spécifiques varie selon les espèces animales concernées ainsi qu'en fonction de la zone géographique considérée. Des recommandations relatives aux agents bactériens spécifiques devant faire l'objet d'une recherche sur les différentes espèces d'*animaux* de laboratoire ont déjà été publiées dans le cadre de divers supports¹.

1. Situation où le statut microbien est défini
 - a) Les *animaux* en colonies dont le statut microbien est défini (voir article 4.10.1.), représentent la source la plus « propre » de gamètes, et les embryons qui sont issus de ces *animaux* peuvent être considérés comme exempts d'agents pathogènes.

- b) Étant donné que les géniteurs ayant fourni la semence et les femelles donneuses sont exempts d'agents pathogènes, la dissection de l'appareil reproducteur de la femelle donneuse et l'isolement des embryons peuvent être pratiqués dans des conditions aseptiques en recourant à une hotte de sécurité biologique si nécessaire.
- c) Bien qu'il ne soit pas nécessaire de conduire l'opération de lavage des embryons selon les recommandations décrites à l'alinéa 2 de l'article 4.10.4., il est néanmoins recommandé de soumettre les embryons à un procédé de lavage comportant deux ou trois étapes. À chaque lavage, les embryons doivent être agités délicatement dans le milieu.
- d) Les embryons doivent être certifiés comme provenant d'une colonie gnotobiotique ou microbiologiquement définie en enceinte de confinement, ce qui indique qu'il est inutile d'adopter des procédures de gestion des risques particulières (voir article 4.10.4.) pour éliminer les agents pathogènes. La nécessité de mettre en quarantaine les femelles receveuses est une question qui doit être prise en compte par l'institut d'importation.

2. Situation ordinaire

- a) Les colonies dont le statut microbien ordinaire correspond à celui de colonies fermées et dont l'état sanitaire est régulièrement suivi (voir article 4.10.1.). Les *animaux* peuvent avoir été exposés à différents agents pathogènes, ce qui peut conduire à des *infections*, avec la détection d'anticorps, ou même à l'expression de signes cliniques mais le ou les agents pathogènes dont on cherche à se protéger dans chaque colonie concernée doi(ven)t cependant être bien connu(s).
- b) L'appareil reproducteur (utérus, oviductes et/ou ovaires) doit être prélevé en un lieu séparé avant d'être transféré au laboratoire de manipulation des embryons. Cette opération doit être réalisée par des techniciens différents de ceux du laboratoire ou, si ce n'est pas le cas, il convient à tout le moins de changer de vêtements de protection entre les deux sites. Si des *animaux* doivent être manipulés dans le laboratoire, les appareils reproducteurs doivent être disséqués dans une hotte de sécurité biologique, pour éviter la dissémination d'agents pathogènes dans le laboratoire.
- c) Après le prélèvement de l'appareil reproducteur, la collecte des embryons doit être réalisée dans des conditions aseptiques. Selon la nature des agents pathogènes dont on sait qu'ils sont présents dans la colonie, les embryons doivent être manipulés conformément aux procédures de gestion du risque, notamment celles relatives au lavage, telles que décrites dans l'article 4.10.4. et dans le Manuel de l'IETS².
- d) Les embryons issus d'*animaux* possédant des anticorps ou présentant d'autres signes de contamination par des agents pathogènes spécifiques ne doivent être transférés dans une nouvelle colonie qu'en appliquant un système de quarantaine et en utilisant des femelles receveuses au statut microbien défini. Une mise en quarantaine peut également être recommandée, en cas de doute sur l'état sanitaire de la colonie ou des femelles donneuses elles-mêmes. Dans certaines situations où des embryons pourraient avoir été exposés à une *infection* bactérienne, ils doivent être mis en culture pendant 24 heures dans un milieu contenant des antibiotiques appropriés, avant cryoconservation, ou dans l'intervalle entre la décongélation et le transfert vers des conteneurs.
- e) Si l'institution destinataire décide de la mise quarantaine des femelles receveuses et des nouveau-nés jusqu'à ce que leur état sanitaire puisse être confirmé, les agents pathogènes dont on cherche à se protéger doivent être recherchés chez les femelles receveuses après le sevrage, et leur descendance ne doit être introduite dans la colonie que si ces résultats sont satisfaisants.

3. Statut microbien non défini

- a) Les embryons qui sont issus d'*animaux* élevés en liberté ou proviennent de colonies dont l'état sanitaire est inconnu doivent être soumis à toutes les procédures de gestion du risque décrites à l'article 4.10.4. et dans le Manuel de PIETS². Ces procédures sont comparables à celles recommandées pour les embryons prélevés sur des *animaux* de rente au chapitre 4.7. et 4.8. du *Code terrestre*. Dans les conditions idéales, les mâles reproducteurs et les femelles donneuses devraient être isolés des autres *animaux* et examinés 15 jours avant ainsi que le jour même de l'accouplement (pour les mâles) ou au moment de la collecte des embryons (pour les femelles). Il est aussi possible d'introduire ces *animaux* dans une colonie ordinaire où il sera possible, au cours du temps, de retracer leurs antécédents sanitaires, en vue de réduire les strictes exigences relatives à leur surveillance et à la manipulation des embryons.
- b) Une hotte de sécurité biologique doit être utilisée pour toute manipulation de donneurs et de tissus issus des organes de reproduction, ainsi que pour la manipulation des embryons.
- c) Une autopsie des femelles donneuses pour détecter la présence de *maladies* ou d'agents pathogènes spécifiques dont cherche à se protéger le *pays importateur* pourra se révéler nécessaire après la collecte des embryons/ovocytes. Le cas échéant, si les embryons sont prélevés dans le cadre d'une intervention chirurgicale, une partie aliquote du liquide de rinçage provenant de chaque donneuse, ou un échantillon de mélange, doivent être analysés pour y rechercher les agents pathogènes importants.
- d) Les embryons doivent être lavés au minimum 10 fois conformément aux protocoles figurant dans le Manuel de PIETS². Un traitement à la trypsine doit être utilisé si l'on craint la présence de certains herpèsvirus.
- e) Les embryons congelés doivent être conservés par le laboratoire exportateur jusqu'à l'achèvement des analyses à réaliser sur les colonies, tissus ou et liquides et les pièces justificatives jointes à la certification doivent être remplies et signées par le *vétérinaire* de l'institut.
- f) À leur arrivée dans le *pays importateur*, les embryons doivent être transférés aux femelles receveuses auxquelles ils sont destinés en utilisant le système de quarantaine. Les femelles receveuses doivent être examinées à des intervalles correspondant aux périodes d'incubation reconnues des *maladies* dont le *pays importateur* cherche à se protéger. En outre, des contrôles doivent être pratiqués non seulement sur les femelles receveuses après transfert mais aussi sur leur descendance à l'âge de 12 semaines et avant d'être introduits dans des colonies de reproducteurs situées en dehors de l'installation de quarantaine.

Article 4.10.7.

Conditions applicables à l'entreposage et au transport des embryons

1. Les embryons destinés à l'exportation doivent être congelés dans l'azote liquide frais et conservés en flacons ou en conteneurs nettoyés et désinfectés contenant de l'azote liquide frais.
2. Les embryons doivent être conservés en ampoules, flacons ou paillettes stériles scellés, en respectant des conditions d'hygiène rigoureuses, dans un lieu d'entreposage agréé par l'*Autorité vétérinaire* du *pays exportateur*, où aucune contamination des embryons ne risque de se produire. On ne doit conditionner ensemble en ampoule, flacon ou paillette que des embryons provenant d'une même femelle donneuse.

3. Les ampoules, flacons ou paillettes doivent être scellés au moment de la congélation (ou avant l'exportation si le processus de cryoconservation n'est pas possible), et ils doivent être clairement identifiés au moyen d'étiquettes, conformément au système normalisé recommandé dans le Manuel de l'IETS². Leur identification doit préciser l'espèce/le génotype des donneurs, le statut microbien (colonie à flore définie, colonie ordinaire ou colonie à statut indéfini), la date de collecte/de cryoconservation, le nombre d'embryons et leur stade de développement, le numéro du récipient ainsi que toute procédure spécifique utilisée (fécondation *in vitro* ou micromanipulation par exemple).
4. Les conteneurs d'azote liquide doivent être scellés sous la surveillance du *vétérinaire officiel* avant leur expédition du *pays exportateur*.
5. Les embryons ne doivent pas être exportés avant l'établissement définitif des certificats vétérinaires requis.

Article 4.10.8.

Procédures de fécondation et de micromanipulation *in vitro*

Si des embryons doivent être produits par fécondation *in vitro* d'ovocytes, il est recommandé d'utiliser exclusivement du sperme lavé afin de limiter autant que possible le risque d'exposition à des agents pathogènes. Si les embryons doivent subir des micromanipulations, impliquant la pénétration de la zone pellucide, l'intégralité des étapes de gestion du risque applicables (notamment les procédures de lavage), comme indiqué au chapitre 4.9., doivent être respectées préalablement au traitement.

-
- 1 **Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guineapig and rabbit breeding colonies.**- Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA), Working Group on Animal Health accepted by the FELASA Board of Management, November (1992).
 - 2 Manuel de la Société internationale de transfert d'embryons.