

ITMO BCDE

Groupe Modèle Souris, Animaleries, Phénotypage

Avant propos

Afin d'avoir une vision stratégique des besoins de la communauté scientifique française dans les études post-génomiques chez l'organisme modèle souris, l'ITMO BCDE a rassemblé un panel d'experts le 17 février et le 24 mars à Paris. L'objet de ces réunions était de considérer les opportunités d'exploiter les nouvelles ressources et les projets développés autour de la biologie de la souris pour la recherche fondamentale et appliquée dans les domaines de la santé et de l'agronomie afin d'éviter de dupliquer les efforts scientifiques, de maximiser l'utilisation des ressources disponibles et à venir (les 21 000 inactivations des gènes de la souris seront disponibles à partir de 2012, les lignées du « Collaborative Cross » (CC), les mutants ENU, les lignées Cre,...) et d'assurer un déploiement optimal des moyens d'équipements et de financement. Les participants de ce comité avaient comme mission d'évaluer les moyens à disposition, d'identifier les enjeux et les outils nécessaires pour répondre aux évolutions et aux ambitions des équipes de recherche française qui utilisent ou souhaitent utiliser ce modèle. Le comité a organisé sa réflexion autour de trois grandes actions:

1. Utiliser les modèles disponibles ou générer de nouveaux modèles
2. Permettre l'analyse fonctionnelle des mutants obtenus à différents niveaux d'échelle, de manière systématique et compréhensive (1^{er} niveau d'analyse) et de manière spécialisée en profondeur (2nd niveau d'analyse),
3. Garantir l'accès, la préservation et la distribution de ces modèles dans la communauté scientifique.

Cette réflexion a conduit à identifier, des objectifs et des besoins listés ci-dessous :

- Identifier les opportunités d'utilisation des lignées mutantes dans la communauté scientifique
- Revoir les opportunités de mutagenèse, de phénotypage, d'archivage et de distribution
- Considérer les capacités et les conditions d'hébergement des souris sur le territoire
- Promouvoir les échanges et les collaborations entre les centres souris et la communauté scientifique dans son ensemble
- Explorer comment la création, le phénotypage, la préservation et la distribution des modèles souris pouvaient être assurés en France.
- Définir les besoins et les bénéfices de la communauté
- Identifier les barrières réduisant ou empêchant l'utilisation des modèles souris
- Discuter comment implémenter les solutions évoquées en incluant les aspects de gouvernance et de gestion des données qui seront produites au travers de ces actions.

1) Utiliser et générer des modèles murins : au-delà des grands programmes de mutagenèse, des allèles plus sophistiqués, des lignées indicatrices, de nouveaux outils de la génétique souris pour de nouvelles questions scientifiques.

L'utilisation grandissante du modèle souris est attestée par de nombreux paramètres: (1) La création de nouvelles animaleries et l'agrandissement des animaleries existantes et ceci sur de nombreux sites. On citera à titre d'exemple l'Institut Pasteur avec quelques cages de souris en 1970 pour 15.000 cages aujourd'hui, dont 1.500 en confinement A3. La même tendance est observée à l'étranger. Des animaleries Souris ont été construites à Harwell (Grande-Bretagne), à Braunschweig et sur l'île de Riems (Allemagne). (2) La part des financements récurrents affectés au fonctionnement des animaleries souris augmente, elle atteint pour certaines unités du CNRS 100% de leur dotation propre. (3) Ces tendances s'accompagnent d'une augmentation d'environ 60% des publications utilisant la souris comme modèle sur les dix dernières années.

De plus le modèle souris n'est plus restreint à un petit nombre de laboratoires de génétique. Il s'est répandu dans de nombreuses communautés, médicales, agronomiques, biologiques,... Il est utilisé couramment dans la plupart des disciplines comme le développement, l'immunologie, l'infectiologie, la reproduction, la neurobiologie, la physiologie,... Il est parfois l'équivalent d'un tube à essai mais contribue souvent en tant que modèle complexe pour les études intégratives. Ces tendances devraient perdurer encore longtemps et continuer de s'amplifier dans les années à venir.

En France, la création des modèles souris est assurée à plusieurs niveaux que l'on peut distinguer par la capacité des centres et le niveau de prise en charge des projets. Des laboratoires fonctionnent plus en local pour les injections d'ADN ou de cellules ES avec des capacités de 15 à 20 lignées KO/an, comme le CIPHE à Marseille, l'Institut Cochin, l'Institut Pasteur, l'Institut Curie mais aussi à Lyon, Montpellier, Toulouse et dans plusieurs autres structures réparties sur le territoire. Au niveau national l'unité TAAM UPS44 avec le Service des Animaux Transgéniques (SEAT) propose également de fabriquer des souris transgéniques à façon (transgénèse classique et ciblée) et des cellules ES modifiées (environ 70 projets par an) et l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Strasbourg) produit environ 150 nouveaux modèles de souris par an en fonction de la complexité des demandes. Avec l'ICS, comme avec le CIPHE, pas besoin de devenir un prodige de la mutagenèse souris, car ces deux structures proposent un soutien complet depuis le design de la construction complète d'inactivation jusqu'à l'obtention de l'animal porteur de la mutation. On estime ainsi la capacité de génération de modèles souris à environ 400 modèles par an pour des coûts variant de 16 à 22 k€ en recouvrant toutes les charges (personnel, fonctionnement, infrastructure, équipement) pour réaliser la construction de ciblage et obtenir au moins une souris porteuse de la nouvelle mutation ou du transgène.

Au niveau international plusieurs programmes ont été initiés dans le but de générer des inactivations pour tous les gènes de la souris: EUCOMM (European Conditional Mouse Mutagenesis Program) est financé par le 6^{ème} programme cadre de l'UE et sera poursuivi par EUCOMMtools afin de compléter EUCOMM et développer de nouveaux outils (lignée Cre); KOMP (Knockout Mouse Project est un projet du NIH, USA; NorCOMM (North American Conditional Mouse Mutagenesis project) est un projet canadien. Le but de ces projets est de produire une collection de mutants nuls et conditionnels de tous les gènes de la souris dans des cellules Embryonnaires Souches (ES), et de les rendre disponibles pour la communauté scientifique. Ces programmes sont coordonnés au niveau international par le consortium IKMC (International Knockout Mouse Consortium) afin de ne pas dupliquer les efforts et d'offrir un portail unique pour l'accès à ces ressources (www.knockoumouse.org). Au 31 mars 2010 14050 gènes avaient été inactivés dans des cellules ES sur les 23 931 gènes identifiés et codant pour des protéines. Il est à noter qu'en dehors de l'ICS dans EUcomm et EUcommtools, il n'y a pas d'autre participation française dans ces programmes. Ce manque de positionnement n'a pas permis à la communauté française de bénéficier pleinement de possibilité de nommer les gènes dans ces programmes de mutagenèse et d'obtenir les mutants plus rapidement. Quoiqu'il en soit, la disponibilité de ces premiers allèles pour l'ensemble des gènes souris va certainement permettre une première exploration de la fonction du gène avec des coûts réduits. Il faut compter de 5000 à 7000 euros pour l'obtention des cellules, le contrôle qualité et l'injection et la transmission de l'allèle. Le coût de réalisation d'un premier mutant est donc diminué de plus d'un tiers et tous ces mutants portent des inactivations comparables dans un fond génétique pur facilitant leur utilisation, et un design pour l'analyse d'expression et l'inactivation conditionnelle et ciblée de la fonction des gènes dans un tissu donné. La mutagenèse conditionnelle représente toujours une tendance très forte dans la communauté pour par exemple dissocier la fonction d'un gène au cours du développement et chez l'adulte. Elle va conduire à une augmentation importante du nombre de lignées de souris dans les animaleries. En effet, pour ces approches la combinaison des allèles floxés avec des lignées exprimant la recombinase Cre, transgénique ou knock-in, est nécessaire pour analyser la fonction des gènes dans un tissu défini. Les lignées Cre sont donc devenues un enjeu pour les laboratoires car elles n'ont pas toutes été produites et décrites avec les mêmes

standards et les mêmes objectifs. La nécessité d'une standardisation des data sur ces lignées est une des questions abordées par le programme européen CREATE avec une coordination internationale sur les outils Cre (CREATE, <http://dev.creline.org/home>). De plus des répertoires existent sur le net CRE-X-Mice d'A. Nagy (http://nagy.mshri.on.ca/cre_new/index.php) et l'initiative du Jackson Laboratory avec le MGI/Cre (<http://cre.jax.org/index.html>) et une banque de souris CreERT2 a été développée à l'ICS (<http://www.ics-mci.fr/crezoo.html>) mais cet effort doit être maintenu. Le développement de lignées Cre concerne tous les domaines de la biologie et leur caractérisation fine ne pourra être obtenue que par un effort conjugué d'un ensemble de laboratoires experts.

Il est important de noter que du fait de leur structure (par exemple gènes composés d'un seul exon ou gènes appartenant à une famille multigénique comme les récepteurs olfactifs) certains gènes ne seront pas ciblés par ce consortium. Par ailleurs, la majorité des mutations présentant une pertinence pour la clinique humaine sont des mutations ponctuelles ou des mutations affectant un domaine fonctionnel particulier d'une protéine, un site d'épissage avec des conséquences variables, engendrant rarement des allèles avec des pertes de fonctions complètes, plus souvent partielles (hypomorphe), ou avec de nouvelles fonctions (néomorphe) voir opposées (antimorphe) ou exagérées (hypermorphe). Ces types de mutations importantes ne sont également pas prises en compte par ce consortium international laissant donc encore un énorme champ de travail non couvert. Aussi, même si cette approche répondra certainement en partie à la caractérisation de la fonction d'un gène; un allèle n'est jamais suffisant pour appréhender toutes les facettes de la fonction d'un gène, si l'on considère le travail réalisé sur d'autres modèles animaux (C. elegans, Drosophile, Poisson Zèbre,...) ou les besoins pour les maladies humaines.

De nouvelles technologies et ressources commencent à bouleverser notre vision du monde et ouvrir de nouvelles perspectives. Ainsi le génotypage et le séquençage haut débit des génomes va certainement faciliter la recherche d'allèles rares dans des populations recombinantes consanguines, non-consanguines ou sauvages, dans des programmes de mutagenèse chimique type ENU in vivo, ou EMS in vitro. Il est important également de considérer de nouvelles ressources comme celles du Collaborative Cross qui va rendre disponibles près de 400 lignées uniques, chacune par la combinatoire d'allèles présents dans leur génome. Ces lignées ont été dérivées par une série de croisements contrôlés de 8 lignées de souris choisies pour leur éloignement. Le développement de nouvelles approches comme la technique des nucléases à doigts de zinc permet d'obtenir rapidement des mutations nulles à un locus donné choisi par avance chez le rat ou d'autres organismes. Le coût aujourd'hui élevé de cette technologie et la disponibilité de méthodes plus raffinées (mutations conditionnelles) expliquent probablement son utilisation limitée chez la souris mais devrait se réduire dans le futur. La possibilité d'induire des remaniements chromosomiques de manière contrôlée devrait permettre d'aborder la fonction et le rôle de ces 97% du génome qui sont non codant ou les conséquences des variations du nombre de copies qui perturbent plus de 12% de notre génome et s'étendent de quelques centaines de kb à quelques Mb. Une autre tendance forte est l'utilisation grandissante des lignées marqueurs reportrices, ou indicatrices, lacZ, ou portant la protéine luciférase bioluminescente ou des variantes de la GFP (Green Fluorescent Protéine) pour suivre l'expression d'un gène, l'activation d'une voie de signalisation, la fonction d'un facteur de transcription ou un lignage cellulaire au cours de la vie de la souris. Ces tendances devraient s'amplifier dans le futur et concourir à la saturation de nos installations expérimentales.

Aussi il est nécessaire pour répondre aux enjeux futurs:

- 1) De continuer de développer des centres d'hébergement nationaux et de proximité pour assurer le maintien et l'accès de ces modèles afin de répondre aux besoins des utilisateurs.

- 2) De s'assurer des accès aux centres de ressources existants pour les transgéniques ou les mutants obtenus dans les cellules ES (IKMC) ou par mutagenèse chimique (RIKEN (Japon) ou au MRC, Harwell) pour générer des séries alléliques
- 3) De renforcer le positionnement de la France dans la génétique des traits complexes chez la souris avec l'accès aux lignées de souris du Collaborative Cross ou des « Recombinant Inbred » qui vont bouleverser les analyses génétiques de ces traits phénotypiques complexes dans les prochaines années tout en renforçant le nombre d'allèles naturels disponibles en génétique murine. Il est à noter un fort besoin en généticiens de la souris.
- 4) De renforcer les structures de mutagenèse et leur accès à toute la communauté scientifique. En particulier pour les équipes et laboratoire travaillant avec des modèles moléculaires, cellulaires voire d'autres organismes modèles, la présence de grands centres permettra un accompagnement plus facile en termes de réalisation, de formation et d'accès à ces ressources spécialisées.
- 5) De poursuivre et prévoir le développement de nouvelles ressources bien caractérisées comme des collections de lignées CRE, de marqueurs d'activités (Ca²⁺-GFP, reporteur de voie de signalisation (NF-kb, Notch,...),...) ou de lignage cellulaire (protéines fluorescentes, luminescentes, à activités identifiables (lac) ou de nouveaux traceurs,...) à l'interface avec l'imagerie fonctionnelle du petit animal (voir phénotypage) qui présentent un grand intérêt pour la communauté des chercheurs et suivre la physiologie de certains types cellulaires voire d'organes.
- 6) De soutenir le développement et le transfert technologique de manière à faciliter la création de nouveaux modèles pour des altérations ponctuelles plus proches des altérations observées chez l'homme, pour la connaissance des séquences non-codantes qui représentent 97% de notre génome, ou des régions soumises à des variations du nombre de copies recouvrant plus de 12% du génome.
- 7) De renforcer les possibilités de financement de la création des modèles. Des financements exceptionnels existent comme celui proposé par le GIS Maladies rares pour créer des souris mutantes à l'ICS ou par le Ministère dans le cadre du plan Alzheimer. L'appel à projets PEPS (Projets exploratoires/Premier soutien) du CNRS peut soutenir le développement de nouveaux modèles murins mais il reste beaucoup à faire dans ce domaine car les programmes très orientés de type ANR n'offrent pas de réponse pour le moment. En effet il faut plusieurs années de travail (au moins un an pour aller de l'idée à l'obtention de la souris KO hétérozygote ou hémizyote, auquel il faut ajouter la validation du modèle ou de la lignée Cre). Un programme ANR spécial pour le développement de modèles expérimentaux est en considération actuellement. Il pourrait financer la création de lignées transgéniques et mutantes.
- 8) De partager ces ressources nouvellement créées dans les meilleures conditions. Par exemple, mise à disposition du nouveau modèle deux ans après sa création dans un centre de ressource pour dissémination et réduire la duplication des efforts.

2. Le phénotypage des modèles souris: Des analyses fonctionnelles complètes et généralistes dans les cliniques vers les plus spécialisées centrées sur les équipes pour une meilleure définition de la relation génotype-phénotype

Comme rappelé dans la partie précédente, plusieurs initiatives Européennes et internationales ont joint leurs efforts pour achever la première mutagenèse complète du génome de la souris. L'objectif total de 21 000 gènes mutés sera quasiment achevé d'ici 2012. En aval de ces programmes de mutagenèse se sont structurées des initiatives complémentaires tout d'abord pour standardiser les tests fonctionnels (le programme Européen EUMORPHIA, www.eumorphia.org) puis pour tester des cribles de phénotypage, complets et haut débit (programme Européen Eumodic pour European Mouse disease clinic, www.eumodic.org). L'organisation de telles analyses est faite sur le modèle suivant: dans une première étape, un crible primaire est mené afin d'identifier les atteintes des grandes fonctions (métabolisme, cardio-respiratoire, immunologie, hématologie, neurologie ...) puis si des atteintes sont

observées, des analyses plus spécialisées de moindre débit sont conduites pour identifier leur origine (crible de deuxième ou troisième niveau dit secondaire ou tertiaire). Un programme de phénotypage est en train de démarrer dans le cadre de l'«International Mouse Phenotyping Consortium» (IMPC) afin de produire la première analyse fonctionnelle compréhensive standardisées et systématique de l'ensemble des gènes chez la souris. L'ensemble des données seront accessibles à la communauté scientifique et devraient permettre à tout laboratoire de pouvoir évaluer l'intérêt d'entamer une étude sur un gène d'intérêt par rapport aux hypothèses fonctionnelles posées.

Une structure en France, l'ICS, participe à cet effort pour l'analyse de première ligne. Il est nécessaire de garantir au mieux le développement de ces analyses primaires pour le bénéfice de la communauté scientifique Française en la faisant participer à la définition du crible pour :

- identifier les fonctions à tester dans le crible minimal primaire;
- développer de nouveaux tests fonctionnels;
- réaliser des cribles principaux de challenge, le cas échéant;
- effectuer le phénotypage de niveau 2 avec un réseau de spécialistes reconnus;
- assurer la formation et le renforcement des capacités.

De nombreux nouveaux défis sont associés à la caractérisation des phénotypes des souris mutantes grâce à ces actions de grande envergure. Afin de générer des données utiles, complètes et normalisées, des plateformes de phénotypage de premier, second et troisième niveau sont nécessaires. Il y a aussi un besoin de bio-informaticiens, de statisticiens et de spécialistes pour respectivement garantir le partage, analyser les données, compléter les ontologies dédiées de sorte que les résultats puissent être utilisés par une communauté la plus vaste possible (en dehors des généticiens ou utilisateurs souris) et comparés entre différents laboratoires, en reconnaissant qu'il y aura toujours des différences dans les environnements qui réduisent la puissance des tests mais pour lesquels nous avons des moyens nouveaux d'identification.

Le coût pour la création, le phénotypage et la préservation de chaque lignée de souris a été estimé à 55 000 € d'après une étude menée dans le cadre de l'IMPC. Ce coût nécessitera d'être optimisé dans le futur par exemple lors de la production des animaux et n'englobe pas les analyses de 2nd et 3eme niveaux plus sophistiquées et diversifiées qui sont adaptées à chaque fois à la problématique mais qui relèvent plus du niveau d'un projet de recherche d'équipe que de structure de plate-forme. En effet il faut souligner l'importance d'assurer l'efficacité, d'opérer des économies d'échelle et que les infrastructures disponibles soient utilisées au maximum. Un modèle de centres intégrés et de nœuds de spécialistes offrent de tels gains d'efficacité mais requièrent une gestion de projet solide et des capacités informatiques suffisantes pour le partage et l'exploitation des données et de définir des missions claires pour assurer l'interface entre les structures. Dans un tel modèle de consortium, les nœuds spécialisés seraient nécessaires pour élaborer et interpréter les résultats de cribles de niveau I entrepris dans un nœud central et le suivi des lignées de souris intéressantes. Les interactions entre les plateformes et les laboratoires spécialisés exigeraient l'identification d'un utilisateur ou d'un groupement scientifique déjà intéressé qui participe au pilotage de la plateforme centrale, puis se chargerait du phénotypage spécialisé secondaire à réaliser de manière standardisée.

Pour accéder à ce niveau d'organisation il faudra :

- 1) Définir un ensemble de tests primaires suffisamment large et robuste pour identifier les lignées d'intérêt pour être étudiées en profondeur en concertation avec la communauté internationale.
- 2) Garantir que toutes les données soient accessibles à la communauté au travers de bases de données ouvertes en respectant une labellisation scientifique et le respect d'un code de conduite à mettre en place ce qui est en soit un défi majeur.
- 3) Sécuriser l'accès et convertir les mutants générés à partir de cellules ES en souris vivantes ce qui peut être un goulot d'étranglement en raison des capacités disponibles mais limitées des

principaux centres. L'utilisation des installations dans les centres devrait être examinée de manière créative pour faire en sorte que les ressources créées soient exploitées de la manière maximale. En outre, afin de minimiser le double emploi, les lignées de souris vivantes devraient être mises à la disposition de la communauté dans le même temps, une fois qu'elles ont été créées.

- 4) Etablir, organiser, et soutenir un réseau national des centres d'analyses secondaires et tertiaires autour d'un centre primaire opérationnel, force de proposition à la définition de protocoles standards reconnus et appliqués par la communauté.
- 5) Développer ou valider de nouvelles technologies pour permettre de réaliser des analyses fonctionnelles encore plus performantes, en particulier le développement de techniques non invasives (imageries fonctionnelles (photonique, radiochimiques ou physique...), ou non terminales (prélèvement de cellules) offrant de nouvelles possibilités.
- 6) Continuer de soutenir des analyses dans d'autres fonds génétiques et d'avoir les capacités à développer une combinatoire. Il est nécessaire de considérer que cette analyse restreinte dans un seul fond génétique ne résoudra pas toutes les questions mais la probable association future par combinatoire et croisement avec d'autres fonds génétiques ouvre des perspectives encore plus larges d'assurer une compréhension étendue des interactions entre les gènes
- 7) Soutenir le développement de supports mathématiques (statistiques) et bioinformatiques associés pour les méta-analyses: la mise en ligne des données, leur représentation et surtout le développement d'analyse systémique de ces données standardisées pour définir des réseaux d'interactions voire de nouvelles hypothèses.
- 8) Financer cette entreprise et établir des partenariats entre bailleurs de fonds et fondations au niveau national et international pour exploiter pleinement cette opportunité. L'ampleur de l'effort exigerait une définition claire de la valeur scientifique associée à la production de ces données, pour permettre aux organismes de financement de faire une évaluation de la valeur de ce financement. L'attribution d'un financement exigerait un équilibre entre les ressources adéquates pour les grands centres et les exigences de la communauté à mener des phénotypages en profondeur et des études secondaires ou tertiaires. Le financement devrait également être subordonné à l'existence d'une gouvernance robuste et stable pour obtenir l'engagement de l'ensemble de la recherche académique. Fait important, la question de la détermination de la structure des coûts en cage dans les animaleries et la variation des coûts pratiqués par les différentes institutions doivent être étudiés plus avant.

3. Partager et préserver : des lignées de souris sans frontières mais dans le réglementaire pour un accès pour tous les laboratoires

L'environnement des souris influe sur les phénotypes. Aussi une stabilité environnementale au sein d'une animalerie donnée est-elle scientifiquement souhaitable pour mieux assurer la constance phénotypique. Les animaleries en France sont soumises à une réglementation et à l'obtention d'un agrément. Elles peuvent avoir plusieurs niveaux de statut sanitaire: Conventionnel concerne l'hébergement d'animaux en bonne santé, hébergeant une flore bactérienne dont on ne peut pas garantir l'absence d'agents pathogènes et opportunistes; SPF pour « Specific Pathogen Free » traduit en français par EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques) ou IOPS (Indemne d'Organismes Pathogènes Spécifiques) contenant des lignées établies à partir d'animaux obtenus par césarienne aseptique ou transfert d'embryons qui sont indemnes d'agents pathogènes majeurs pour l'espèce (liste FELASA, Federation of European Laboratory Animal Science Associations, www.felasa.org); SOPF pour « Specific Opportunistic and Pathogen Free » souvent confondu avec EOPS, concerne des élevages créés à partir d'animaux obtenus par césarienne aseptique ou transfert d'embryons qui sont indemnes d'agents pathogènes majeurs et de certains microorganismes opportunistes à préciser dans une liste; et enfin les Gnotoxénies pour des Animaux obtenus par césarienne aseptique ou transfert d'embryons inoculés par un ou plusieurs microorganismes connus; voir

Axénie avec des animaux obtenus par césarienne aseptique, indemnes de microorganismes détectables. Ces définitions reprises par le référentiel des centres de transgénèse établi en 2006 cadrent les appellations sanitaires mais n'empêchent pas parfois des dérives sur le terme EOPS.

Les modalités d'accueil d'une nouvelle lignée dans une animalerie doivent prendre en compte ces différents paramètres et conditionnent les procédures nécessaires pour partager les modèles. Ces particularités des modèles de souris et les contraintes techniques de leur maintenance sont des challenges majeurs pour la recherche *in vivo*. En d'autres termes, au niveau des animaleries de l'hexagone, il faut savoir gérer l'entropie (associé à la multiplicité combinatoire moléculaire entre autre) et la stabilité (associé au statut sanitaire de l'animalerie donnée) pour distribuer et échanger les lignées murines d'intérêt.

On peut estimer que plus de 5000 lignées de souris sont maintenues sous forme respirante en France, avec plus de 3000 lignées différentes. Leur taux de renouvellement devrait être autour de 10%, donc 300-400 importations par an. Le partage de ces lignées modèles implique souvent un contact personnel, établi via les réseaux d'experts ou sociétés savantes, et s'implémente généralement sous forme de collaboration. Des réseaux informels ont été créés pour aider à activer et formaliser ces échanges, comme le Kia7souris en France (<http://kia7souris.curie.fr/>). Ce dernier, à titre d'exemple, est dédié à la localisation des lignées de souris dans l'hexagone et repose sur l'initiative des chercheurs. Comme toute autre importation de lignées, cette modalité implique le respect des agréments de transfert existants, des règles académiques et des statuts sanitaires. Kia7souris traite les demandes pour environ 50 lignées de souris mutantes par an. Son utilité est évidente, mais un suivi récent n'est pas disponible. Il est à noter que ce système ne nécessite pas une liste intégrale des souris existantes dans les institutions partenaires, cependant ce réseau repose sur le fait qu'il y a de telles listes au niveau des institutions et leur service d'animalerie. Une telle liste intégrale et sa mise à jour poseraient le problème de la confidentialité.

Le partage peut s'organiser donc par interaction individuelle, par le créateur de la lignée, par réseaux informels ou des centres de ressources, comme EMMA ou le Jackson Lab. Dans tous les cas, le partage collaboratif nécessite des infrastructures pour pouvoir recevoir le matériel. Au cœur des préoccupations se trouve le statut sanitaire des lignées. Une animalerie qui accepte toutes les souris indifféremment du statut sanitaire n'aura à terme qu'une faible attractivité due à l'accumulation des pathogènes. De l'autre côté, les sites qui ont investi pour maintenir un statut sanitaire EOPS doivent ensuite systématiquement recourir à la re-dérivation pour accepter de nouvelles lignées. Des seuils de statut sanitaire ont été établis sous forme de listes de pathogènes (cf. celles de la FELASA). Cependant, cela ne permet visiblement pas aux animaleries de s'aligner pour augmenter leur compatibilité. Bien au contraire, avec chaque mise à blanc et ouverture de nouvel élevage propre, le nombre de germes opportunistes détectés, et par la suite acceptés, diminue. Par conséquent, avec la re-dérivation obligatoire sous régime EOPS, le partage des lignées s'est fortement ralenti. Cependant, l'existence de lignées EOPS facilite le partage vers le conventionnel propre. Puisque toute intervention sur les animaux EOPS constitue un risque sanitaire, et compte tenue des coûts du statut sanitaire EOPS, il se pose aussi la question de la réactivité des recherches *in vivo* et leur rentabilité sous un régime EOPS exclusif.

Pour pouvoir partager, il semble donc important pour un grand nombre de sites de disposer (i) au moins d'une animalerie d'expérimentation EOPS, (ii) d'une possibilité de re-dérivation avec quarantaine, et (iii) d'une animalerie conventionnelle qui, sans investissements excessifs, permet des expérimentations préliminaires ou ponctuelles, notamment dans le domaine de l'imagerie *in vivo* qui devient indispensable dans beaucoup de domaines. Idéalement ce set minimal devrait être renforcé par des animaleries EOPS dédiées au maintien des noyaux et à l'expansion des lignées avec une gestion des risques sanitaires plus stricts : personnels dédiés, aucune entrée directe de lignée sans redérivation,...

Un fonctionnement des animaleries en réseau, comme on pourrait le souhaiter, ne peut pas se réaliser sans une structure à différents niveaux de confinement et la possibilité à la fois de travailler en zone conventionnelle et de re-dériver efficacement, de façon centralisée ou décentralisée. Pour fonctionner en réseau, les services doivent développer une harmonie entre personnels, structures, équipement, et fonctionnement. Ceci demande aussi une sensibilisation et formation continue du personnel et des chercheurs, ainsi le Club des Belles Souris et ROCAD, le Réseau Opérationnel des Centres d'Archivages et de Distribution des modèles souris, soutenu par le GIS IBiSA, sont des plateformes de réflexion et de communication avec des groupes de travail dédié avec d'autres initiatives ouvertes à d'autres modèles animaux le pôle expérimental animaux modèles de l'INRA ou le réseau EFOR, pour l'exploration fonctionnelle des organismes modèles. Par soucis d'économie, la cryopréservation d'embryons précoces ou de gamètes mâles s'est substituée au maintien des lignées respirantes. L'ensemble des opérations associées à la cryopréservation et la revitalisation peut s'effectuer suivant des règles sanitaires optimales et codifiées. Puisque préserver fait appel au transfert d'embryons, il y a donc une passerelle efficace entre préservation et partage : logiquement, le goulot d'étranglement se trouve actuellement au niveau de la cryopréservation et de la revitalisation des stocks.

Le Jackson Laboratory, aux États-Unis, est la référence mondiale dans le domaine de la cryopréservation et la redérivation des lignées. Leur site web fait référence concernant nomenclature et organisation de l'archivage. Au niveau européen, un des buts du réseau *European Mouse Mutant Archive* (EMMA) est la cryoconservation et la distribution des lignées. En revanche, ils congèlent uniquement les embryons fournis par les laboratoires demandeurs qui ont généré les lignées. Le stockage n'est pas anonyme et l'établissement d'un MTA (Material Transfert Agreement) est quasi obligatoire. Cette congélation et ce stockage sont décentralisés dans différents centres à travers l'Europe. Le TAAM à Orléans qui participe à ce réseau est considéré comme la souristhèque Française avec une grande capacité de cryopréservation et de re-dérivation. De plus, différents centres et instituts, dont Curie et Pasteur, réalisent généralement des sauvegardes précoces mais pas dans un but de distribution.

Aussi pour faciliter les échanges et préserver des modèles qui pourront être étudiés plus tard sous de nouveaux angles, il est important:

- 1) De conserver des centres nationaux pour la préservation et la distribution des lignées de souris.
- 2) De faciliter les échanges des modèles en développant des capacités de redérivation, par des techniques de revitalisation et de fécondation in vitro, soit à proximité des laboratoires utilisateurs soit dans des centres de références comme le TAAM à Orléans.
- 3) De développer un répertoire systématique des lignées créées en France et cryopréservées au niveau national afin de permettre l'accès à tous les utilisateurs.
- 4) De former les responsables d'animalerie et les soigneurs animaliers en réseau afin de leur faire partager la même culture et les mêmes références.
- 5) De proposer plusieurs niveaux d'hébergement des lignées de souris en conservant un statut EOPS (FELASA) tout en gérant les risques de rupture de la barrière sanitaire (EOPS stricte, EOPS expansion, EOPS expérimentation, Conventionnelle). Le contrôle de la flore bactérienne intestinale devrait être conduit car il interfère avec de nombreux paramètres physiologiques.
- 6) D'avoir des capacités de re-dérivations dans les centres locaux pour faciliter les échanges.
- 7) De former les utilisateurs de ces lignées de souris aux bonnes pratiques. En dehors des aspects réglementaires (agrément, OGM, expérimentation, éthique) il est important d'avoir des capacités de formation pour les nouveaux utilisateurs (ex : cours de génétique souris de l'Institut Pasteur).
- 8) De revoir la nouvelle réglementation OGM qui a besoin de continuer d'évoluer pour ne pas devenir un frein à la recherche avec des améliorations sur la prise en compte des types d'OGM et sur la combinatoire gérée au niveau du site et du projet.

- 9) D'établir des partenariats avec les fournisseurs reconnus, comme dans le cadre de la Fédération Internationale des centres de ressources murins (FIMRE) avec des accords facilitant les échanges entre les structures de préservation pour un meilleur accès au modèle.
- 10) De pouvoir négocier des contrats cadres avec les fournisseurs privés pour garantir la disponibilité de ressources comme les lignées de fonds génétiques standards (Charles Rivers, TACONIC, Janvier,...).
- 11) D'harmoniser la procédure de transfert de matériels entre les structures académiques.

Groupe d'experts auteur de la contribution :

Florian Guillou (INRA, Tours)

Yann Hérault (coordonnateur, CNRS, Illkirch)

Martin Holzenberger (Inserm, Paris)

Lionel Larue (Inserm, Paris)

Marie Malissen (CNRS, Marseille)

Jean-Jacques Panthier (Institut Pasteur, Paris)

Sylvie Schneider-Maunoury (Inserm, Paris)