



HAL
open science

Caractérisation épidémiologique, histologique et étiologique d'une entérite nécrosante aiguë chez la souris de laboratoire en lactation

Sylvain Lavocat

► **To cite this version:**

Sylvain Lavocat. Caractérisation épidémiologique, histologique et étiologique d'une entérite nécrosante aiguë chez la souris de laboratoire en lactation. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-04075339

HAL Id: dumas-04075339

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04075339v1>

Submitted on 20 Apr 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Année 2022

**CARACTÉRISATION ÉPIDÉMIOLOGIQUE, HISTOLOGIQUE ET
ÉTIOLOGIQUE D'UNE ENTÉRITE NÉCROSANTE AIGÜE CHEZ LA
SOURIS DE LABORATOIRE EN LACTATION**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 15 novembre 2022

par

Sylvain, Claude, Alain LAVOCAT

sous la direction de

Fanny PILOT-STORCK

JURY

Président du jury :	M. Marc ELOIT	Professeur à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Fanny PILOT-STORCK	Professeur à l'EnvA
Examineur :	M. Edouard REYES-GOMEZ	Maître de Conférences à l'EnvA

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



Version du 8 février 2022

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigé	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Maître de conférences HDR	DPASP
M	Blot	Stephane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loic	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Fédérighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneq	Christelle	Maître de conférences HDR	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
M	Perrot	Sébastien	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Benchebkroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Constant	Fabienne	Maître de conférences	DPASP
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
Mme	Decambron	Adeline	Maître de conférences	DEPEC
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences associé	DPASP
M	Desbois	Christophe	Maître de conférences	DEPEC
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guélin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
M	Mauffré	Vincent	Maître de conférences	DPASP
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
Mme	Mespoulhès-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Maître de conférences	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP

Remerciements

Au Président du Jury de cette thèse, M. Marc ELOIT, Professeur à l'EnvA,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,

Hommage respectueux.

À Mme Fanny PILOT-STORCK, Professeur à l'EnvA,

Qui a accepté d'encadrer ce travail,

Pour votre soutien et vos conseils précieux,

Sincères remerciements.

À M. Edouard REYES-GOMEZ, Maître de conférences à l'EnvA,

Qui a accepté de participer à mon jury de thèse et à l'encadrement de ce travail,

Pour votre disponibilité,

Sincères remerciements.

Table des matières

Liste des figures	3
Liste des tableaux	5
Liste des abréviations	7
Introduction	9
Première partie : bibliographie	11
1. Contexte au sein de l'animalerie et état des connaissances	11
A. <i>Description épidémiologique, clinique et lésionnelle de l'affection au sein de l'animalerie</i>	11
a. Données épidémiologiques, individus concernés et lignées génétiques.....	11
b. Signes cliniques	11
c. Lésions.....	11
d. Gestion de l'affection au sein de cette animalerie	12
B. <i>Recherche étiologique : état des connaissances</i>	14
a. Suspicion d'une origine génétique	14
b. Suspicion d'une origine métabolique.....	14
c. Suspicion d'une origine infectieuse bactérienne	14
2. Etude préliminaire : exploration d'une origine infectieuse virale.....	23
A. <i>Exclusion d'une origine non-infectieuse : génétique ou environnementale</i>	23
B. <i>Exploration d'une origine infectieuse</i>	23
a. Exploration d'une infection bactérienne	23
b. Exploration d'une affection virale (Rapport de stage Noémie Bach, 2017)	23
3. Etat des connaissances sur les virus murins compatibles	34
A. <i>Astrovirus</i>	34
a. Caractéristiques de l'astrovirus murin	34
b. Données épidémiologiques	34
c. Signes cliniques associés aux astrovirus	35
d. Mécanismes cellulaires	36
e. Lésions histologiques.....	36
f. Réponse immunitaire à une infection à l'astrovirus murin	36
g. Transmission de l'astrovirus murin.....	37
h. Méthodes de détection de l'astrovirus murin	37
B. <i>Norovirus</i>	37
a. Caractéristiques moléculaires des norovirus.....	37
b. Données épidémiologiques	38
c. Signes cliniques associés aux norovirus	39
d. Mécanismes cellulaires	39
e. Lésions histologiques.....	39
f. Réponse immunitaire face à une infection à norovirus murin.....	40
g. Transmission des norovirus murins.....	41
h. Méthodes de détection.....	41
C. <i>Influence du microbiote intestinal sur les virus entériques</i>	42
a. Influence du microbiote intestinal sur les astrovirus	42
b. Influence du microbiote intestinal sur les norovirus.....	42
Deuxième partie : étude expérimentale	43
1. Introduction	43
2. Matériels et méthodes	45
A. <i>Etude épidémiologique : réalisation d'une base de données</i>	45
a. Construction de la base de données.....	45
b. Analyse statistique	45
B. <i>Animaux</i>	47
a. Conditions de vie des souris	47

b. Caractéristiques des individus utilisés dans cette étude	47
C. Autopsie et prélèvements.....	47
D. Etude histologique.....	48
a. Préparations des prélèvements	48
b. Méthode de réalisation des lames	48
c. Photographies.....	48
d. Description histologique.....	48
E. Recherche d'agent infectieux.....	49
a. Etude de causes bactériennes.....	49
b. Etude de causes virales par RT-qPCR	49
3. Résultats.....	53
A. Etude épidémiologique à partir de la base de données.....	53
a. Age des femelles.....	53
b. Rang de parité	53
c. Taille des portées.....	55
d. Occurrence d'entérite nécrosante chez les mères des femelles allaitantes	55
e. Occurrence d'entérite nécrosante aiguë selon le mâle d'accouplement	56
B. Caractérisation histologique des lésions.....	58
a. Description de coupes du système digestif d'une souris saine	58
b. Description histologique de coupes d'intestin grêle d'une souris à un stade débutant.....	60
c. Description de coupes d'intestin grêle d'une souris à un stade lésionnel intermédiaire	62
d. Description de coupes d'intestin grêle d'une souris à un stade lésionnel avancé	66
C. Etude étiologique : cultures bactériennes et RT-qPCR	68
a. Etude des causes bactériennes	68
b. Etude de causes virales par RT-qPCR	68
4. Discussion.....	75
A. Discussion technique	75
a. Recherche bibliographique	75
b. Qualité de la base de données	75
c. Contraintes liées à l'analyse statistique	75
d. Autopsie et méthode de prélèvement.....	75
e. Préparations histologiques.....	75
f. Méthodes de détection utilisées dans l'exploration d'une origine infectieuse.....	75
g. Réalisation des RT-qPCR.....	77
B. Discussion scientifique.....	79
a. Etude épidémiologique.....	79
b. Caractérisation histologique des lésions	80
c. Conclusion étiologique.....	81
Conclusion.....	87
Liste des références bibliographiques	89
Annexe 1 : Exemple d'un fichier de géotypage.....	97
Annexe 2 : Feuille de suivi quotidien.....	98
Annexe 3 : Aperçu du cahier d'élevage	99
Annexe 4 : Feuille d'autopsie	100
Annexe 5 : Caractéristiques des individus contrôles.....	101
Annexe 6 : Caractéristiques des individus atteints d'entérite nécrosante aiguë	103
Annexe 7 : Base de données épidémiologiques	105

Liste des figures

Figure 1 : Lésions macroscopiques chez une souris retrouvée moribonde et euthanasiée.	12
Figure 2 : Résultats d'alignements de séquences sur les contigs lors de l'étude préliminaire (Bach, 2017).	26
Figure 3 : Résultats d'alignements de séquences sur les singletons (Bach, 2017).	27
Figure 4 : Résultat d'électrophorèse des amplicons issus de la qPCR sur l'échantillon de départ (Bach, 2017).	31
Figure 5 : Résultats des gammes de dilution à partir de l'échantillon du souriceau de départ pour chaque couple d'amorces (Bach, 2017).	32
Figure 6 : Classification des astrovirus (2019, Wohlgemuth).	35
Figure 7 : Classification des norovirus (2019, Ford-Siltz).	38
Figure 8 : Distribution des souris atteintes d'entérite nécrosante aiguë et des souris non atteintes en fonction de l'âge au moment de la mise-bas.	53
Figure 9 : Distribution relative (A) et absolue (B) des femelles atteintes d'entérite nécrosante aiguë et des femelles non atteintes en fonction du rang de parité.	54
Figure 10 : Distribution des souris atteintes d'entérite nécrosante aiguë et des souris non atteintes en fonction de la taille de la portée.	55
Figure 11 : Coupe histologique transversale du duodénum (A et B) et du côlon (C) d'une souris contrôle.	59
Figure 12 : Coupe histologique transversale du duodénum chez une souris à un stade débutant de l'entérite nécrosante aiguë.	61
Figure 13 : Coupe transversale du duodénum chez une souris morte d'entérite nécrosante aiguë à un stade intermédiaire.	63
Figure 14 : Coupe transversale du jéjunum chez une souris morte d'entérite nécrosante aiguë à un stade intermédiaire.	64
Figure 15 : Coupe histologique transversale de gros intestin de souris morte d'entérite nécrosante aiguë à un stade intermédiaire.	65
Figure 16 : Coupe histologique transversale du duodénum d'une souris morte d'entérite nécrosante aiguë à un stade avancé.	67
Figure 17 : Gel d'électrophorèse des amplicons issus des réactions d'ajustement de la température d'hybridation.	70
Figure 18 : Dépôt sur gel d'électrophorèse des amplicons issus des différentes réactions de mise au point de la qPCR pour les couples d'amorces astro 2 et 3.	71

Figure 19 : Gel d'électrophorèse des amplicons issus des réactions de mise au point de la qPCR pour les couples d'amorces noro 1 et 2.72

Figure 20 : Gel d'électrophorèse des amplicons issus de la réaction de PCR à partir des échantillons positifs pour au moins un des couples d'amorces lors des réactions de qPCR.74

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification mise à jour de <i>Clostridium perfringens</i> en 2018 (Rood, 2018).....	15
Tableau 2 : Caractéristiques des couples d’amorces utilisées en RT-qPCR pour la détection des séquences obtenues grâce à l’analyse bioinformatique (Bach, 2017).....	29
Tableau 3 : Valeur du cycle seuil à partir de l’échantillon de départ pour chaque couple d’amorces.	30
Tableau 4 : Répartition des souris selon l’exposition « occurrence de l’entérite nécrosante aiguë chez la mère de la souris ».....	55
Tableau 5 : Tableau de contingence pour la variable « occurrence de l’entérite nécrosante aiguë selon le mâle d’accouplement ».	56
Tableau 6 : ADN extraits du contenu intestinal de six souris atteintes d’ENA	68
Tableau 7 : Valeur de base du cycle seuil des six individus atteints d’entérite nécrosante aiguë pour les couples d’amorces astro 2 et noro 1.	69

Liste des abréviations

µg : microgramme

µL : microlitre

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : acide ribonucléique

AVM : astrovirus murin

BLAST : *basic local alignment search tool*

bp : paire de bases

Cellule M : *microfold cells*

C. perfringens : *Clostridium perfringens*

C. piliforme : *Clostridium piliforme*

CPB2 : toxine Beta2 de *C. perfringens*

CPtA : *C. perfringens* de type A

CPtB : *C. perfringens* de type B

CPtC : *C. perfringens* de type C

CPtD : *C. perfringens* de type D

CPE : *Clostridium perfringens* enterotoxin ou entérotoxine

CPtE : *C. perfringens* de type E

CPtF : *C. perfringens* de type F

CPtG : *C. perfringens* de type G

Ct : *cycle threshold* ou cycle seuil

dNTP : désoxyribonucléotide

EDTA : éthylènediaminetriacétate

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

EnvA : Ecole nationale vétérinaire d'Alfort

EOPS : exempt d'organisme pathogène spécifique

HES : hémalun-éosine-safran

IFN : interféron

IL : interleukine

kcal/kg : kilocalorie/ kilogramme

M : molaire

mM : millimolaire

NetB : toxine entéro-nécrosante B

NetF : toxine entéro-nécrosante F

NGS : *next generation sequencing*

NTC : *no template control*

NVM : norovirus murin

OP1 : *outer primer 1*, amorce d'extrémité 1

OP2 : *outer primer 2*, amorce extrémité 2

ORF : *open reading frame* ou phase ouverte de lecture

PCR : réaction de polymérisation en chaîne ou *polymerase chain reaction*

PFO : perfringolysine O

PiliF : *primers C. piliforme forward*

PiliR : *primers C. piliforme reverse*

RT-qPCR : *reverse transcription quantitative PCR*

RIN : *RNA integrity number*

SOPF : *open shortest path first*

RT : rétrotranscription

TepL : toxine perfringens large

Tm : température de fusion

Introduction

En mars 2016, la mort soudaine de plusieurs souris entre la 2^e et la 3^e semaine de lactation a été observée au sein d'une animalerie de l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort (EnvA). Cette affection se manifestait généralement par une mort subite sans signes d'appel mais certaines souris ont quelques fois présenté des signes de douleurs tels qu'une réticence à se déplacer, une prostration, un masque facial douloureux et un désintérêt pour leur portée. Des signes cliniques digestifs ont parfois été observés tels qu'une diarrhée ou une souillure de la zone anale. A l'autopsie, ces souris présentaient toutes une distension abdominale causée par une dilatation et une nécrose de l'intestin grêle rappelant un état de putréfaction bien que cette altération se produisait ici du vivant de l'individu. La présence d'un liquide intestinal malodorant de couleur noire et des suffusions hémorragiques au bout des doigts, du museau ou encore des mamelles étaient régulièrement observées. Au sein de l'animalerie de l'EnvA, cette affection à caractère sporadique a majoritairement concerné des femelles allaitantes bien que dans de très rares cas des mâles ou des souriceaux aient été affectés.

A ce jour, plusieurs publications décrivent une affection similaire se manifestant par des signes cliniques et des lésions proches dans un contexte épidémiologique identique et ce, dans tous types de laboratoires répartis dans le monde entier (Dagnaes-Hansen *et al.*, 2010; Feinstein *et al.*, 2008; Fray *et al.*, 2008; Iwai et Hoberman, 2014; Krugner-Higby *et al.*, 2006; Kunstýř, 1986). Malgré une documentation dans différentes publications, la prévalence réelle de cette affection est probablement sous-évaluée, d'une part, à cause de la confusion entre les manifestations lésionnelles de l'affection et une décomposition post-mortem et d'autre part, du fait de l'absence de consensus quant à la dénomination de cette lésion dont les appellations sont nombreuses : *ileus and paresis of peristalsis* (Kunstýř, 1986), *deficient lactation syndrome* (Krugner-Higby *et al.*, 2006), *fatal acute intestine pseudoobstruction* (Feinstein *et al.*, 2008), *postpartum ileus* (Whary *et al.*, 2015), *lactation ileus* (Fray *et al.*, 2008). Différentes hypothèses étiologiques ont été mises en avant par ces publications. Certaines études proposent une origine infectieuse suite à l'observation de bactéries telles que *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) (Kunstýř, 1986), dont la présence a quelques fois été étayée par la mise en évidence de toxines. D'autres articles envisagent une origine non-infectieuse, notamment une cause métabolique étant donné les caractères ubiquitaire et sporadique stable peu en faveur d'un processus infectieux ou l'absence d'agent pathogène mis en évidence (Dagnaes-Hansen *et al.*, 2010).

Face à l'impact éthique, aux conséquences sur l'activité de recherche et sur l'état psychologique du personnel, une recherche de l'agent infectieux en cause a été initiée au sein du laboratoire. Dans un premier temps, plusieurs analyses bactériologiques réalisées à partir d'échantillons prélevés sur les cadavres ont permis de mettre en évidence une mort par septicémie non spécifique par rupture de la barrière intestinale sans pouvoir incriminer d'agent pathogène bactérien particulier. Devant la multitude d'éléments en faveur d'un processus infectieux, une recherche d'agent pathogène viral a été mise en œuvre par l'équipe « Découverte de pathogènes » de l'Institut Pasteur. A partir d'un souriceau, théoriquement soumis à une quantité d'agents viraux plus faible qu'un adulte, ayant présenté des lésions caractéristiques de l'affection, un séquençage à haut débit sans *a priori* de l'ensemble des ARN messagers (ARNm) présents dans l'intestin grêle a été réalisé. Cette approche a permis d'identifier des séquences d'ARNm de norovirus, connu pour être présent au sein de l'animalerie, et d'astrovirus murin en très grande quantité, dont la famille est décrite comme entéropathogène chez l'Homme (Dagnaes-Hansen *et al.*, 2010).

Dans ce manuscrit, nous proposerons une description épidémiologique, anatomo-pathologique et étiologique de cette affection afin d'améliorer sa détection dans les animaleries concernées et permettre sa prise en charge. Dans un premier temps, une analyse épidémiologique consistera à tester certaines hypothèses provenant de publications citées précédemment grâce à une base de données réalisée à partir des souris en lactation décédées dans l'animalerie du laboratoire de l'EnvA. Dans un second temps, une description anatomo-pathologique et histologique des lésions permettra de proposer un consensus quant à l'appellation de la lésion qui a touché cette animalerie. Le terme d'entérite nécrosante aiguë (ENA) sera utilisé dans le reste de ce manuscrit pour désigner la lésion citée précédemment. Enfin, une étude étiologique a été conduite dans le but de déterminer si une composante infectieuse était à l'origine de cette affection. Sur la base des précédentes descriptions cliniques et épidémiologiques de l'affection, issues de la littérature, une recherche de clostridies à partir d'échantillons d'intestin grêle a été réalisée : *C. perfringens* par une mise en culture anaérobie et *C. piliforme* par amplification en chaîne par polymérase (PCR) nichée. En parallèle et sur la base des données issues des travaux préliminaires, une recherche par rétrotranscription *quantitative PCR* (RT-qPCR) d'astrovirus et de norovirus a été réalisée à partir des échantillons d'intestin d'autres souris atteintes d'ENA. Nous concluons enfin sur les éléments les plus saillants de cette étude.

Première partie : bibliographie

1. Contexte au sein de l'animalerie et état des connaissances

A. Description épidémiologique, clinique et lésionnelle de l'affection au sein de l'animalerie

a. Données épidémiologiques, individus concernés et lignées génétiques

Au sein de cette animalerie, l'affection étudiée a touché toutes les lignées génétiques et concerné environ une femelle sur 10 pour un total de 54 souris allaitantes décédées sur 562. Les souris concernées étaient majoritairement primipares et en 2^e ou 3^e semaine de lactation. Plus rarement, quelques nouveau-nés retrouvés morts, ou individus mâles retrouvés prostrés ont présenté une entérite nécrosante aiguë.

b. Signes cliniques

Cette affection se présentait presque systématiquement par une mort d'apparition brutale sans signe d'appel bien que quelques femelles aient été retrouvées dans un état moribond.

Ces femelles moribondes présentaient des signes de douleur aiguë se manifestant par un masque facial marqué avec les vibrisses orientées caudalement, une prostration, le dos voussé et par une réticence à se déplacer. La portée était systématiquement délaissée avec des souriceaux froids, agglutinés les uns aux autres et parfois moribonds. D'autres signes cliniques pouvaient être observés, notamment digestifs avec des selles de différents aspects à mesure de l'évolution de la maladie : diarrhéiques, muco-diarrhéiques puis muqueuses. L'issue de cette affection était systématiquement la mort en quelques heures. Lorsqu'une souris atteinte d'ENA était détectée avant la mort, elle était systématiquement euthanasiée immédiatement et ses petits mis à l'adoption.

c. Lésions

D'un point de vue lésionnel, les individus atteints présentaient régulièrement des suffusions hémorragiques au bout des doigts, du museau ou encore des mamelles.

Une distension abdominale sans signe du flot, causée par une dilatation sévère de l'intestin grêle était systématiquement présente (Figure 1a). Un liquide intestinal malodorant de couleur noire ou une substance muco-diarrhéique étaient généralement associés à cette dilatation. L'aspect de cette substance évoluait en fonction du degré d'avancement de l'affection, allant d'une diarrhée classique à l'aspect d'un mucus transparent. Le duodénum était toujours affecté, le jéjunum et l'iléon pouvaient être également atteints selon le degré d'évolution de la maladie. Cette dilatation s'accompagnait également d'une congestion de la muqueuse et d'une nécrose totale ou partielle de l'intestin grêle selon le degré d'atteinte, rappelant un état de putréfaction bien que cette altération se produisait du vivant de l'individu (Figure 1b).

Enfin, certains individus présentaient une péritonite associée à une dilatation des vaisseaux du mésentère et du péritoine viscéral. Les annexes du tube digestif, le côlon et les autres organes abdominaux étaient toujours épargnés, tout comme les organes de la cavité thoracique d'apparence normale.

Figure 1 : Lésions macroscopiques chez une souris retrouvée moribonde et euthanasiée.

(A) Mise en évidence du médiastin après réclinaison des côtes. Le cœur, les poumons et les vaisseaux ne montrent aucune anomalie. La cavité abdominale est également visible : le duodénum apparaît dilaté et noir. (B) Etalement du tube digestif. Noter la dilatation et la nécrose sévère du duodénum qui apparaît noir dans sa portion proximale et s'éclaircit à mesure que l'on progresse distalement. Le jéjunum et l'iléon sont également atteints. Le caecum et le gros intestin ne montrent aucune anomalie macroscopique.



d. Gestion de l'affection au sein de cette animalerie

La prévalence et les conséquences de cette affection ont grandement perturbé l'unité de recherche. En premier lieu, la morbidité et la mortalité associées à cette affection représentaient une entrave au bien-être des animaux, fondements de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale. Les travaux de recherche étaient également impactés par la mort de souris allaitantes issues de lots expérimentaux et ses conséquences sur leurs portées. Des mesures ont ainsi été mises en place afin de surveiller les portées et sauver un maximum de souriceaux en cas de décès de leur mère.

- *Surveillance accrue des femelles en lactation*

Dans un premier temps, les souris allaitantes ont été regroupées dans la même salle sur un même portoir afin de procéder à une surveillance accrue. En semaine, les zootechniciennes étaient chargées d'inspecter de façon régulière l'état de santé et le comportement de chaque femelle allaitante. Les week-ends et jours fériés, un système d'astreinte très rigoureux a été mis en place afin de poursuivre cette surveillance.

- *Adoption des portées*

Une adoption précoce des souriceaux a constitué une mesure efficace à condition que la découverte de la femelle morte ou moribonde n'ait pas été trop tardive. Ces adoptions répondaient à plusieurs critères afin de maximiser les chances de survie de la portée : nombre de souriceaux de la portée de la mère adoptive, stade de lactation de la mère adoptive et destination des petits.

Dans un premier temps, la taille des souriceaux à adopter devait être similaire à celle de la portée originelle afin que les petits des deux portées puissent profiter du lait maternel et que leur croissance soit équivalente.

Dans un second temps, plusieurs facteurs dépendant de la femelle adoptive étaient à considérer et ont conduit le plus souvent à des adoptions multiples. Tout d'abord, le nombre maximal de petits par

femelle adoptive était de 10 afin d'assurer une quantité de lait suffisante pour chaque souriceau, critère le plus contraignant étant donné le nombre de petits par portée. De plus, les femelles en fin de lactation alors proches du tarissement devaient être évitées. D'autre part, les mélanges de petits destinés à l'entretien d'une lignée ne devaient pas être confiés à une femelle dont les petits étaient destinés à la constitution d'un lot expérimental pour ne pas perturber leur croissance. Enfin, compte tenu de l'instinct peu maternel de la lignée majoritaire de l'animalerie, les C57B6, le transfert de la portée orpheline à la portée adoptive devait être réalisé après marquage des petits par l'urine de la femelle adoptive. Les petits, une fois imprégnés, étaient insérés dans le nid avec les autres.

- *Mesure définitive : redériver des portées*

Bien que les mesures évoquées ci-dessus aient permis de sauver la majorité des portées orphelines lorsque les femelles étaient découvertes à temps, elles ne permettaient pas de gérer la cause de l'affection. Parmi les solutions décrites et envisageables, une mise à blanc de l'animalerie associée à une redériver des portées semblait la plus efficace (Fray *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2022). Considérant le contexte du laboratoire avec un déménagement prévu dans une nouvelle animalerie au printemps 2020, cette redériver a été reportée à l'ouverture des nouveaux locaux.

B. Recherche étiologique : état des connaissances

Bien que peu documentée, une affection à l'origine d'une mortalité brutale et d'une nécrose de l'intestin dans des conditions épidémiologiques similaires est décrite dans la littérature sous différentes appellations : *ileus and paresis of peristalsis*, *deficient lactation syndrome*, *fatal acute intestine pseudoobstruction*, *postpartum ileus*, *lactation ileus*.

Ces descriptions impliquent pour la plupart la mort de femelles entre la 2^e et la 3^e semaine de lactation, d'apparition brutale, sans signe d'appel (Dagnaes-Hansen *et al.*, 2010; Feinstein *et al.*, 2008; Fray *et al.*, 2008; Iwai et Hoberman, 2014; Krugner-Higby *et al.*, 2006; Kunstýř, 1986). Cette mortalité brutale s'accompagne systématiquement d'une distension abdominale causée par une dilatation et une nécrose de l'intestin grêle. Parfois, ces descriptions impliquent des individus mâles et des souriceaux trouvés dans un état moribond présentant des lésions intestinales similaires (Kunstýř 1986 ; Krugner-Higby *et al.* 2006 ; Feinstein *et al.* 2008). Généralement, les souriceaux sont retrouvés morts à proximité de leur mère.

L'étude de Feinstein (2008), la plus détaillée, semble en de nombreux points la plus proche de ce que nous avons observé au sein de notre animalerie. Sur la base de leur observation histologique et des données de la littérature, plusieurs origines d'ordre génétique, métabolique ou infectieuse ont été envisagées.

a. Suspicion d'une origine génétique

La majorité des descriptions évoque une atteinte de toutes les lignées génétiques des animaleries et exclut toute origine génétique (Feinstein *et al.*, 2008; Kunstýř, 1986). La lignée C57Bl6 est surreprésentée du fait de leur présence majoritaire dans les animaleries.

b. Suspicion d'une origine métabolique.

A défaut de mettre en évidence un agent infectieux causal, certains auteurs ont mis en avant une origine métabolique (Dagnaes-Hansen *et al.*, 2010; Feinstein *et al.*, 2008; Krugner-Higby *et al.*, 2006; Kunstýř, 1986). Une demande énergétique excessive au pic de lactation serait à l'origine d'une faiblesse extrême chez ces souris. L'état corporel altéré par la lactation en cours serait amplifié par leur mise à la reproduction avant la fin de leur croissance et leur ré-accouplement au cycle suivant (Kunstýř, 1986). D'autre part, une expérience consistant à compléter ces souris avec une ration riche en lipide, du beurre de cacahuète, s'est montrée efficace dans la prévention des morbidités et de la mortalité (Krugner-Higby *et al.*, 2006).

En revanche, l'implication d'une hypoglycémie ou d'une hypocalcémie au cours de la lactation (Kunstýř, 1986) n'a pas été corroborée par la mesure du calcium sanguin qui s'est révélée normale dans l'étude de Feinstein (2008). De plus, ce type de lésions intestinales n'est pas rapporté lors d'hypoglycémie. Malgré ces résultats, Feinstein *et al.* (2008) n'excluent pas l'implication d'un élément métabolique compte tenu du moment d'apparition de la mort.

c. Suspicion d'une origine infectieuse bactérienne

La plupart des études citées précédemment comprennent systématiquement une recherche d'agents infectieux en particulier *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*). *C. Perfringens* est connu pour son rôle lors de maladies digestives chez plusieurs espèces mais n'a parfois pas été observé (Kunstýř, 1986), ou alors, a été mis en évidence sans qu'on puisse établir un lien de causalité avec l'affection (Dagnaes-Hansen *et al.*, 2010; Feinstein *et al.*, 2008).

A l'inverse, certaines publications ont mis en évidence à la fois *C. Perfringens* et ses toxines chez des souris allaitantes (Krugner-Higby *et al.*, 2006) ou chez de jeunes nouveau-nés (Matsushita et Matsumoto, 1986). Deux agents pathogènes bactériens sont connus pour induire une mort soudaine potentiellement associée à une entérotoxémie chez plusieurs types d'espèces : *C. perfringens* et *Clostridium piliforme* (*C. piliforme*).

- *Clostridium perfringens*

C. perfringens est une bactérie à coloration Gram-positif qui se présente sous la forme d'un bacille produisant des spores. Il a été isolé pour la première fois à la fin du 19e siècle chez l'Homme. Il possède un métabolisme de type anaérobie strict et sa mise en culture dans les milieux usuels est difficile car ils ne permettent pas sa sporulation.

Il existe plusieurs souches de *C. perfringens* capables de synthétiser une vingtaine de toxines responsables de maladies aux signes cliniques variés et affectant différentes espèces. Depuis 2018, un consensus (Rood, 2018) a mis à jour la classification de *C. perfringens*. Les toxines qualifiées de majeures sont passées au nombre de six : α , β , ϵ , ι , l'entérotoxine (CPE) et la toxine entéro-nécrosante B (NetB). La classification de *C. perfringens* compte deux types supplémentaires classés en fonction du nombre de toxinotypes synthétisés : A (CPtA), B (CPtB), C (CPtC), D (CPtD), E (CPtE), F (CPtF) et G (CPtG) (Tableau 1). Par ailleurs, la diversité des signes cliniques de *C. perfringens* est aussi attribuable à d'autres toxines dites « mineures », participant ou responsables de maladies digestives variées : la toxine entéro-nécrosante F (NetF), la perfringolysine O (PFO) et la toxine de Beta2 de *C. perfringens* (CPB2).

Enfin, selon de récentes découvertes la virulence de *C. perfringens* serait également associée à la synthèse d'enzymes de dégradation extracellulaire (Navarro *et al.*, 2018) : NanI et NanJ sont des exosialidases alors que NanH est une sialidase cytoplasmique.

Tableau 1 : Classification mise à jour de *Clostridium perfringens* en 2018 (d'après Rood, 2018).

La classification passe de cinq à sept types de *C. perfringens* et de quatre à six toxinotypes : les types F et G font leur apparition et les toxines CPE et NetB sont désormais considérées comme des toxines majeures. On considère que la CPE n'est plus synthétisée par CPtA mais par CPtF. D'autre part, CPtG synthétise la toxine NetB.

Toxinotype	Toxine α	Toxine β	Toxine ϵ	Toxine ι	CPE	NetB
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	+/-	-
D	+	-	+	-	+/-	-
E	+	-	-	+	+/-	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

Cette partie permettra de faire un bilan des différents types de *C. perfringens* et des maladies associées aux différents toxinotypes. Néanmoins, il existe peu de descriptions d'épizooties à *C. perfringens* chez les rongeurs bien qu'ils aient servi de modèles d'étude dans l'évaluation du pouvoir pathogène de chaque toxine ou de certaines épizooties chez d'autres espèces. D'autre part, le nombre de toxines de *C. perfringens* permet une large diversité de maladies dont l'origine et les mécanismes exacts sont souvent difficiles à déterminer.

□ C. perfringens de type A

L'une des principales descriptions d'affection digestive similaires à notre colonie met en cause CPtA et sa toxine α (Krugner-Higby *et al.*, 2006). De plus, CPtA est également associé à des maladies digestives chez la volaille et les mammifères. Néanmoins, depuis la réorganisation de la classification de *C. perfringens*, le rôle de la toxine α lors de maladies entériques n'est plus établi et serait éventuellement dû à ses toxines mineures.

CPtA porte les gènes de la toxine α et de plusieurs toxines mineures dont la toxine entéro-nécrosante B (NetB), la toxine entéro-nécrosante F (NetF) et la toxine beta2.

Caractéristiques de la toxine α

La toxine α est un polypeptide de 42,5 kDa synthétisé par toutes les souches de *C. perfringens*. Avec une dose létale 50 (DL50) de 3 μ g/kg, la toxine α est l'une des toxines les moins virulentes de *C. perfringens*, néanmoins elle provoque une gangrène gazeuse gravissime qui se manifeste par une nécrose des tissus musculaires et sous-cutanés (Awad *et al.*, 1995). Présente de manière ubiquitaire dans l'environnement et le système digestif de l'Homme ainsi que la plupart des animaux, la toxicité de la toxine α au niveau intestinal dépend de sa concentration (Uzal *et al.*, 2016). A forte concentration, elle entraîne une altération de la membrane plasmique et la mort cellulaire. A l'inverse, à faible dose elle induit des cascades de réactions à l'origine d'une hémolyse.

Maladies associées à la toxine α

La « *yellow lamb disease* » est une maladie associée à CPtA et la toxine α chez l'agneau. Elle se manifeste principalement par un ictère généralisé, peut conduire à une mort soudaine mais ne provoque pas de signes cliniques digestifs. Une épidémie de « *yellow lamb disease* » différente, à *C. perfringens* de type D (CPtD) produisant une quantité de toxine α anormalement élevée a également été décrite (Uzal *et al.*, 2016). Néanmoins, l'ictère généralisé, l'hématurie et l'atteinte rénale ne correspondent pas aux lésions macroscopiques observées au sein de notre colonie.

Comme évoqué précédemment, CPtA et ses toxines α ont été isolées par PCR au sein d'une colonie de femelles allaitantes affectée par une mortalité soudaine similaire à nos observations (Krugner-Higby *et al.*, 2006). Néanmoins, les femelles retrouvées moribondes ou mortes au cours de leur deuxième semaine de lactation présentaient une entérocolite nécrotico-hémorragique sévère qui n'est pas décrite dans les autres descriptions évoquées précédemment. D'autre part, le lien de causalité entre la toxine α et la mort des souris n'a pas été établi.

Maladies associées à la toxine entéro-nécrosante F

La toxine NetF serait associée à une gastroentérite hémorragique chez le chien et une entérocolite nécrosante chez le poulain¹ (Uzal *et al.*, 2016).

Maladie associée à la toxine entéro-nécrosante B

Chez la volaille, CPtA est principalement associé à des entérites nécrosantes. Néanmoins, des lésions similaires ont été associées à des souches de CPtA dont le gène pour la toxine α a été inactivé, suggérant ainsi un rôle mineur. Une récente découverte a permis d'identifier la toxine NetB

¹ Néanmoins, le postulat de Koch n'a pas été validé pour ces deux espèces et le caractère hémorragique ou l'atteinte colique ne correspondent aux observations faites au sein de notre colonie.

chez des poulets atteints d'entérite nécrosante, structurellement similaire à la toxine β , dont l'inactivation du gène entraîne une perte de virulence de *C. perfringens* (Keyburn *et al.*, 2008).

Maladie associée à la toxine beta2

CPB2 est un polypeptide de 28 kDa peu connu du fait de sa récente découverte. CPB2 est létale lors d'injection intraveineuse chez la souris. Elle provoque des lésions d'entérite hémorragique sur un modèle d'anse ligaturée chez le cochon d'Inde (Gibert *et al.*, 1997; Uzal *et al.*, 2016).

□ *C. perfringens* de type B

CPtB a été mis en évidence chez des souris *balb/-c* dans une animalerie de laboratoire de recherche accidentellement contaminée plusieurs mois auparavant (Rozenfurt et Sanchez, 1999). Ces souris présentaient plusieurs signes cliniques similaires à l'affection touchant notre colonie. CPtB est également connu pour son tropisme digestif chez d'autres espèces et est à l'origine d'entérites potentiellement mortelles chez le mouton ou plus rarement chez les ovins et les équidés.

CPtB porte les gènes des toxines α , β , δ et ϵ .

Caractéristiques des toxines synthétisées par *C. perfringens* de type B

La toxine β est un polypeptide de 35 kDa dont la DL50 est de 400 ng/kg. Elle fait partie de la famille des toxines formant des pores β au niveau de la membrane plasmique avec les toxines δ , *beta2* et NetB. *In vitro*, ces pores entraînent des flux ioniques de part et d'autre de la membrane à l'origine d'œdèmes puis de l'éclatement de cellules humaines HL60 et de cellules endothéliales (Nagahama *et al.*, 2003; Steinhorsdottir *et al.*, 2000).

La toxine ϵ est un polypeptide de 29 kDa dont la DL50 est de 100 ng/kg. Seules les toxines botulique et tétanique possèdent une DL50 inférieure. Elle appartient à la famille des aérolysines formant des pores responsables d'une nécrose des cellules cibles. La toxine ϵ est capable d'agir localement mais agirait exclusivement par entérotoxémie au niveaux des cellules endothéliales de l'encéphale et des reins (Fernandez-Miyakawa *et al.*, 2007a). Cette particularité sera plus amplement développée ci-après.

L'action des toxines β et ϵ semble être conditionnée par l'environnement (Fernandez-Miyakawa *et al.*, 2007a). La toxine β est dégradée par l'action de protéases telle que la trypsine alors que la toxine ϵ est activée par des protéases. De plus, en l'absence d'inhibiteur de trypsine, la mortalité chez des souris *Balb/c* inoculée avec CPtC dans le duodénum décroît drastiquement (Uzal et McClane, 2011). Ainsi, chez le nouveau-né, l'immaturation du système de digestion associée à l'action des inhibiteurs de trypsine présents dans le colostrum favorise l'action de la toxine β et l'altération de la muqueuse intestinale. A l'inverse, chez l'adulte, la trypsine fonctionnelle inactiverait la toxine β et favoriserait l'action par entérotoxémie de la toxine ϵ (Uzal *et al.*, 2016).

Découverte plus tardivement, la toxine δ joue un rôle dans l'altération de la muqueuse intestinale. Cette protéine de 32 kDa également produite par CPtC, cible les gangliosides GM2 pour former des pores au niveau de la membrane plasmique et perturber les flux ioniques (Manich *et al.*, 2008). Chez un modèle d'anse ligaturée chez la souris, la toxine δ a permis l'accumulation de liquide dans la lumière intestinale et a causé des lésions de la muqueuse (Seike *et al.*, 2019). De plus, cette accumulation de liquide est inhibée en présence d'anticorps antitoxine δ .

Maladies associées à *C. perfringens* de type B

Comme évoqué précédemment, CPtB a été décrit chez la souris *Balb/c* dans une animalerie de laboratoire (Rozenfurt et Sanchez, 1999).

Les souris affectées étaient majoritairement des femelles multipares âgées de quatre à sept mois. La maladie se manifestait par une prostration associée à une distension abdominale, une douleur à la palpation et une réticence à se déplacer. Néanmoins, des signes cliniques respiratoires incompatibles avec notre colonie étaient également observés telle qu'une dyspnée, et seule une femelle a été retrouvée morte. A l'autopsie, une dilatation de l'intestin grêle et du gros intestin a été observée chez toutes les femelles. De plus, une dilatation de la cavité atriale gauche et un thrombus étaient parfois mis en évidence.

Chez d'autres espèces, CPtB a été associé à des entérites nécrotico-hémorragiques chez le nouveau-né, en particulier chez l'agneau, le veau et le poulain. Chez l'agneau, la maladie associée à CPtB porte le nom de dysenterie. Elle se manifeste par des diarrhées hémorragiques associées à une douleur et une distension abdominales. Des signes neurologiques sont également rapportés lors d'entérotoxémie liée à la toxine ϵ . A l'autopsie, des lésions d'entérites nécrosantes hémorragiques ou ulcératives fibrineuses sont observées. Lors d'entérotoxémie, des lésions au niveau du foie, du rein, de la rate ou de l'encéphale peuvent être mises en évidence.

Synergisme de *C. perfringens* de type B et *C. perfringens* de type C

Des études de neutralisation et d'inactivation génique ont également permis de mettre en évidence une synergie d'action entre CPtB et CPtC. La neutralisation de la toxine β permet de protéger des souris d'une injection intraveineuse de toxines de CPtC. De son côté, CPtC jouerait un rôle dans la régulation de CPtB (Francisco A Uzal, 2016).

□ *C. perfringens* de type C

CPtC est responsable d'entérites nécrosantes et d'entérotoxémies chez le nouveau-né d'espèces de rente, l'Homme (Petrillo *et al.*, 2000) et d'autres mammifères (Uzal et Songer, 2008). Compte tenu de son importance épidémiologique et sa gravité clinique, plusieurs modèles d'études ont été développés afin d'améliorer la connaissance de cet agent infectieux (Uzal et McClane, 2011).

C. perfringens de type C (CPtC) porte les gènes des toxines α , β , CPB2, de la perfringolysine O (PFO) ou encore de la toxine perfringens large (TepL).

Rôle de la toxine β lors d'infection à *C. perfringens* de type C

Le pouvoir pathogène de CPtC dépend de la toxine β : une injection intraveineuse est létale chez la souris (Fisher *et al.*, 2006). Chez la souris *Balb/c* inoculée avec CPtC dont le gène de la toxine β a été inactivé, on observe une perte de la létalité lors d'inoculation intra-duodénale ou l'absence de signes cliniques lors d'inoculation intra-gastrique (Uzal *et al.*, 2009a, 2009b). D'autre part, la toxine β induit une altération locale de l'épithélium intestinal qui est favorisée chez le nouveau-né par l'action inhibitrice du colostrum sur la trypsine. De plus, la toxine β est également capable d'agir par entérotoxémie (Uzal et McClane, 2011).

Maladie associée à *C. perfringens* de type C

Chez la souris *Balb/c* inoculée au niveau du duodénum, CPtC est capable d'induire une multitude de signes cliniques (Uzal *et al.*, 2009a). Ces souris développent des signes généraux tels qu'un abattement, une prostration et une distension abdominale. Par entérotoxémie, des signes cliniques

respiratoires et neurologiques sont observés. La mort, secondaire à l'entérotoxémie, survient en 24 heures selon la dose inoculée.

A l'autopsie, une dilatation de l'intestin grêle prédomine bien que le caecum et le côlon puissent être concernés. La muqueuse intestinale, fine et transparente, contient un mélange de gaz et de liquide séro-hémorragique. Au niveau du myocarde, un œdème interstitiel est observé chez la moitié des individus. Néanmoins, les lésions d'entérite nécrosante sévère observées au niveau de l'iléon et du jéjunum chez les animaux de rente ou le modèle d'anse ligaturé chez le lapin ne sont pas retrouvées chez la souris (Uzal et McClane, 2011; Uzal et Songer, 2008).

Caractéristiques de la perfringolysine O et de la toxine perfringens large

La PFO est un polypeptide de 46 kDa dont la DL50 de la PFO est de 15 µg/kg soit une toxine peu létale (Uzal *et al.*, 2010). Elle appartient à une famille de cytolysine dépendante de la fixation à une molécule de cholestérol et permet la formation de pores dans la membrane plasmique dont le diamètre est dix fois supérieur à ceux générés par l'entérotoxine de *C. perfringens* (CPE).

L'inactivation du gène *pfoA* de souches de CPTC CN3685 n'a pas montré de rôle significatif lors de maladies digestives chez un modèle d'anse ligaturée chez le lapin (Sayeed *et al.*, 2008). Les mêmes conclusions ont été tirées pour la toxine α. Le pouvoir pathogène de la PFO s'exprime majoritairement par synergie avec CPTA en inhibant l'arrivée de sang et l'afflux de leucocytes au site d'infection, augmentant ainsi son action lytique.

□ *C. perfringens* de type D

CPTD est responsable d'entérotoxémies vraies chez les ovins et les caprins lors de changement brutal de régime alimentaire. Afin de mieux comprendre les maladies à CPTD, des modèles d'études murins ont été développés.

C. perfringens de type D porte les gènes des toxines α, ε, de PFO et CPB2.

Rôle de la toxine ε lors d'infection à *C. perfringens* de type D

La toxine ε a une importance majeure lors d'entérotoxémie à CPTD. Chez les ovins, les caprins et la souris, l'inoculation duodénale de souches de CPTD entraîne une phase clinique aiguë qui précède la mort alors que des souches dont le gène ε a été inactivé n'engendrent pas de signes cliniques (Garcia *et al.*, 2013). Chez la souris BALB/c, des formes végétatives de CPTD injectées par voie intraveineuse sont neutralisées par des anticorps monoclonaux dirigés contre la toxine ε (Sayeed *et al.*, 2005).

Comme évoqué précédemment, la toxine ε est activée dans l'intestin, où elle est capable d'agir localement (Uzal et Kelly, 1996). Néanmoins, sa virulence s'exprime lorsqu'elle rejoint la circulation sanguine pour se diriger vers les cellules endothéliales (Mander *et al.*, 2020). Elle cible principalement l'encéphale, les reins, le cœur et les poumons au niveau desquels elle induit une augmentation de la perméabilité vasculaire conduisant à l'éclatement des cellules. A long terme, elle provoque une nécrose tissulaire qui se manifeste principalement au niveau de l'encéphale chez le mouton (Buxton et Morgan, 1976).

Bien que des anticorps dirigés contre les toxines α et la PFO n'empêchent pas la mort des souris BALB/c inoculées avec une injection intraveineuse de CPTD (Sayeed *et al.*, 2005), ces toxines

potentialisent la létalité de la toxine ϵ chez la souris : injectées avec la toxine ϵ dans l'estomac de souris BALB/c, la toxine α et la PFO réduisent le temps de survie (Fernandez-Miyakawa *et al.*, 2008).

Maladies associées à *C. perfringens* de type D

L'hypothèse d'une association entre une carence énergétique et une infection à CPtD a été envisagée chez la souris dans une étude suite à l'amélioration significative de la morbi-mortalité chez des femelles allaitantes après enrichissement de la ration en lipides (Krugner-Higby *et al.*, 2006). Cependant, cette étude rapporte l'observation de lésions d'entérocolite nécrosante et l'isolement par PCR de toxines de type A uniquement.

A l'inverse, CPtD est plutôt décrit lors de maladies digestives chez les ovins et les caprins appelées maladie du rein pulpeux ou encore *overeating disease*. Cette maladie affecte les agneaux et les chevreaux de plus de 15 jours mais peut également toucher les adultes soumis à un brusque changement de ration enrichie en glucides.

Une description des signes cliniques et des lésions a été réalisée chez les ovins, les caprins et la souris BALB/c grâce à une méthode d'inoculation duodénale de souches sauvage et modifiée de CPtD (Uzal et Songer, 2008). Les ovins présentaient principalement des signes cliniques respiratoires et neurologiques qui s'accompagnaient d'un œdème cérébral ou pulmonaire et d'un hydropéricarde. Néanmoins, chez la chèvre une forme chronique de la maladie peut s'accompagner de diarrhées hémorragiques et de douleur abdominale associées à des lésions d'entérocolites fibrino-nécrotiques. Une mort soudaine est décrite chez ces deux espèces lors de forme aiguë de la maladie.

Chez la souris, l'étude précédente n'évoque aucune lésion malgré un abattement, des signes cliniques neurologiques et respiratoires.

□ *C. perfringens* de type E

Aucune description d'infection à CPtE n'a été décrite chez la souris de laboratoire. Néanmoins, chez d'autres espèces, CPtE est associé à des maladies digestives.

CPtE porte les gènes des toxines α et ι .

Caractéristiques de la toxine ι

La toxine ι est uniquement synthétisée par CPtE et appartient à la famille des toxines clostridiennes binaires. Elle est composée de deux polypeptides appelés IA et IB (Stiles et Wilkins, 1986), respectivement de 47,5 et 71,5 kDa, activés suite à l'action de protéases. Ces deux polypeptides agissent de façon synergique au niveau intracellulaire : IB permet l'endocytose du complexe puis la toxine IA interagit avec les molécules d'actine du cytosquelette pour induire la mort de la cellule. Les DL50 sont de 620 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour IA et 940 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour IB (Gill, 1982; Uzal *et al.*, 2010). La toxine ι est ainsi la moins létale des toxines de *C. perfringens*.

Maladies associées à la toxine ι

Chez un modèle d'anse intestinale ligaturée de souris Swiss, la toxine ι est à l'origine d'une accumulation de liquide dans l'intestin grêle dont la muqueuse apparaît rouge et épaissie (Redondo *et al.*, 2017). Des entérites hémorragiques, intéressant le jéjunum et l'iléon, et des entérotaxémies associées à la toxine ι sont respectivement décrites chez le veau et l'agneau nouveau-nés (Songer

et Miskimmins, 2004). La toxine ϵ serait capable d'entraîner une mort soudaine chez le veau, les chevreau nouveau-nés ou encore la souris de laboratoire (Stiles et Wilkins, 1986).

Chez le cochon d'Inde, la toxine ϵ provoque une augmentation de la perméabilité vasculaire conduisant à une nécrose de la peau (Craig et Miles, 1961).

Chez le lapin, CPtE entraîne un amaigrissement et serait associé à une diarrhée hémorragique. Les lésions intéresseraient principalement le caecum mais l'iléon et le côlon proximal peuvent être atteints (Borriello et Carman, 1983). Néanmoins, le diagnostic d'une infection à CPtE est difficile du fait du manque de spécificité des signes cliniques et des lésions. De plus, certaines entérotoxémies attribuées à CPtE chez le lapin pourraient être en réalité dues à des réactions croisées avec une toxine similaire à la toxine ϵ chez *Clostridium spiroforme*, appelée *ITX-like* (Songer, 1996).

□ C. perfringens de type F

CPtF est responsable de toxi-infections alimentaires et d'affections d'origine non alimentaire chez l'Homme. Six à 8% des souches de *C. perfringens* possèdent le gène de la CPE, porté soit par le chromosome et responsable d'infections alimentaires, soit par un plasmide à l'origine d'infections gastro-intestinales d'origine non alimentaire.

CPtF porte les gènes des toxines α et la CPE. Les types C, D et E sont également capables de produire la CPE.

Caractéristiques de l'entérotoxine

La CPE est une protéine de 35 kDa majoritairement synthétisée par CPtF sous sa forme sporulée (Rood *et al.*, 2018). Cette sporulation est favorisée par l'environnement intestinal. La CPE est dotée d'une double action. Localement, elle altère l'épithélium intestinal au niveau de la pointe des villosités et entraîne une accumulation de liquide dans la lumière intestinale à l'origine d'une diarrhée (Caserta *et al.*, 2011). Par entérotoxémie, elle agit à distance au niveau des cellules épithéliales ou endothéliales du foie et des reins.

La CPE subit une oligomérisation suite à sa fixation sur des protéines des jonctions serrées, les claudines. La formation d'un pore dans la membrane plasmique permet des flux ioniques de part et d'autre de la membrane (Caserta *et al.*, 2011). Un flux sortant de potassium serait à l'origine de la létalité de la CPE. Cette hypothèse est corroborée par une autre étude pendant laquelle l'injection intraveineuse de potassium et de CPE a été à l'origine de modifications électrocardiographiques similaires (Katahira *et al.*, 1997). Néanmoins, la dose létale 50 de la CPE est de 140 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ce qui en fait une toxine peu létale.

Maladies associées à C. perfringens de type F

C. Perfringens de type F (CPtF) est principalement associé à des toxi-infections alimentaires ou des affections non alimentaires.

Chez un modèle d'anse intestinale ligaturée de souris, une faible dose de CPE est associée à une apoptose des villosités intestinales induites par l'activation de la caspase-3. A l'inverse, une forte dose entraîne une nécrose des villosités. Néanmoins, l'inhibition de la caspase-3 intestinale sur le même modèle n'empêche pas l'apparition de lésions intestinales ou la mort par entérotoxémie (Freedman, 2018).

D'autre part, des colites nécrosantes fatales induites par la CPE sont décrites dans des conditions particulières chez l'Homme (Bos, 2005). Une stase fécale empêcherait l'évacuation de la CPE dans l'intestin et favoriserait le passage de la toxine dans le sang.

□ C. perfringens de type G

C. perfringens de type G (CPtG) entraîne une entérite nécrosante chez plusieurs espèces de volaille (Keyburn *et al.*, 2008). Néanmoins, aucune infection à CPtG n'a été décrite chez la souris.

CPtG porte les gènes des toxines α et entéro-nécrosante B (NetB). La toxine NetB est un polypeptide de 33 kDa capable de former des pores au niveau des membranes cellulaires. NetB est directement responsable de l'entérite nécrosante : les volailles inoculées avec des souches inactivées de NetB ne développent pas d'entérite (Keyburn *et al.*, 2008).

Les individus infectés par CPtG développent des diarrhées, une réticence à se déplacer ou encore une dilatation de l'intestin par un contenu liquidien brunâtre. Néanmoins, les lésions sont majoritairement des ulcérations fibrino-nécrotiques de la muqueuse qui concernent principalement le jéjunum et l'iléon (Cooper *et al.*, 2013).

• *Maladie de Tyzzer : Clostridium piliforme*

La maladie de Tyzzer a été initialement décrite chez les souris de laboratoire puis chez d'autres espèces animales dont l'Homme. L'agent responsable de cette maladie est une bactérie filamenteuse, intracellulaire à Gram négatif, appelée *Clostridium piliforme* (*C. piliforme*), qui peut être présente sous forme végétative ou sporulée (Uzal *et al.*, 2016).

□ Signes cliniques et lésions associées

Chez la souris, l'infection est généralement asymptomatique mais peut entraîner des signes cliniques chez les jeunes au moment du sevrage, les individus immunodéficients ou lors de co-infection avec d'autres agents pathogènes (Clifford et Pritchett-Corning, 2012).

Les signes cliniques se manifestent principalement par une mort subite bien que des épisodes de diarrhée aqueuse profuse ou une souillure de la zone péri-anales soient décrits. Chez le rat, une distension abdominale est également décrite mais n'a pas été rapportée chez la souris (Clifford et Pritchett-Corning, 2012). Les lésions sont presque systématiquement localisées au niveau du foie et du caecum, parfois sur l'intestin ou le cœur. Chez la souris, elles se manifestent principalement par une typhlite, une nécrose hépatique et intestinale (Livingston *et al.*, 1996).

Chez le rat, une dilatation sévère de l'iléon est observée (Uzal *et al.*, 2016). D'autres lésions telles que des pétéchies, des ulcérations de la muqueuse intestinales et la formation de pseudomembranes sont rapportées (Clifford et Pritchett-Corning, 2012).

2. Etude préliminaire : exploration d'une origine infectieuse virale

A. Exclusion d'une origine non-infectieuse : génétique ou environnementale

La fréquence de l'affection étant de 10%, une origine non-infectieuse était cohérente avec une distribution des cas de type sporadique et stable dans le temps. L'hypothèse d'une origine génétique a été exclue d'emblée étant donné le nombre de publications rapportant une distribution variée des lignées (Feinstein *et al.*, 2008; Kunstýř, 1986). De plus, cette observation était retrouvée au sein de notre animalerie dans laquelle toutes les lignées étaient affectées. Des causes environnementales ont été envisagées mais l'alimentation utilisée était similaire à celle distribuée dans une autre animalerie située sur un site à plusieurs kilomètres de l'emplacement de l'EnvA. D'autre part, l'environnement était contrôlé en termes de température et d'hygrométrie.

B. Exploration d'une origine infectieuse

Compte tenu du peu d'éléments en faveur d'une origine non infectieuse, l'hypothèse d'une origine infectieuse a été approfondie.

L'émergence brutale de cette affection dans un environnement stable au sein d'une animalerie a été un premier argument en faveur de cette hypothèse, d'autant plus qu'elle coïncidait avec l'arrivée de nouveaux membres au sein de l'équipe ayant fréquenté d'autres animaleries ou possédant des rongeurs. De plus, cette affection est apparue après l'introduction de nouvelles lignées de souris en provenance d'autres établissements et la possible intrusion épisodique de rongeurs sauvages.

D'un point de vue clinique, le caractère infectieux de cette affection était d'autant plus cohérent que la mort de souriceaux était associée aux mêmes signes cliniques et suivait la mort de leur mère. Par ailleurs, quelques cas étaient rapportés dans une pièce de l'animalerie gérée par du personnel appartenant à une autre équipe de recherche, de façon indépendante du reste de la colonie et avec un système d'élevage différent : cages jetables sur portoirs ventilés, autre type de litière et d'alimentation. Enfin, une redérivation des lignées était décrite comme une solution efficace dans la lutte contre cette affection (Fray *et al.*, 2008), et c'est de fait ce qui a pu être observé par cette équipe lors de l'installation dans de nouveaux locaux, après redérivation.

a. Exploration d'une infection bactérienne

L'exploration de causes infectieuses a débuté avec la recherche d'un agent causal bactérien par le laboratoire de bactériologie de l'EnvA. L'analyse n'a pas permis de mettre en cause une population de bactéries particulière. Cependant, la mise en évidence de bactéries de la flore commensale au niveau de l'encéphale de plusieurs femelles a permis de conclure à une mort par septicémie causée par une translocation bactérienne.

b. Exploration d'une affection virale (Rapport de stage Noémie Bach, 2017)

L'analyse bactériologique non concluante associée à la forte présomption d'une origine infectieuse nous a conduits à solliciter le laboratoire « Découverte de pathogènes » de l'Institut Pasteur, sous la direction du Pr Marc Eloit, dans le but d'identifier une cause virale. Ce travail, réalisé par Noémie Bach, étudiante vétérinaire en 3^e année à l'époque, a constitué la base de notre recherche étiologique.

Aucune hypothèse étiologique n'a été favorisée et une technique de diagnostic sans *a priori*, appelée métagénomique ou encore *Next Generation Sequencing* (NGS), a été privilégiée. Cette approche permet de séquencer l'ensemble des acides nucléiques présents dans un échantillon en s'affranchissant de toutes hypothèses étiologiques préalables (Pérot *et al.*, 2017), contrairement aux techniques de PCR ou de sérologie. Compte tenu de l'absence d'hypothèses, la vérification des résultats à chaque avancée a été un des enjeux de ce travail préliminaire.

- *Choix de l'individu*

Pour cette recherche de pathogènes sans *a priori*, un échantillon d'intestin d'un souriceau ayant présenté les mêmes signes cliniques que sa mère et mort peu de temps après a été choisi. En théorie, un jeune animal est porteur d'une plus faible quantité d'agents pathogènes qu'un adulte. L'identification d'un agent viral a de grande chance dans ce cas de correspondre à l'agent causal et possède une flore intestinale moins développée permettant de réduire la quantité d'ADN bactérien séquencée, de moindre intérêt dans cette étude.

- *Extraction et séquençage des ARN*

Afin de pouvoir identifier tous les agents pathogènes potentiellement présents dans l'échantillon, une extraction de tous les ARN a été réalisée à l'aide d'un kit *QIAgen* de séparation de phase trizol/chloroforme et sur colonne de silice, kit choisi pour sa facilité d'utilisation et son rendement optimal.

Face à la fragilité des ARN et afin de garantir la conformité des futurs résultats, un contrôle de la pureté et de la qualité des ARN a été nécessaire avant de constituer les banques NGS. La réalisation de puce à ARN, mesurant la quantité d'ARN en fonction de la taille des fragments a permis de calculer un score de qualité : *le RNA integrity number* (RIN). Un ARN dont le RIN est supérieur à sept est considéré comme intègre. L'ARN du souriceau présentait un RIN de 6,2 jugé acceptable.

Dans un second temps, la pureté de l'ARN a été mesurée par spectrophotométrie Nanodrop : les ratios 260/280 et 260/230, permettent d'évaluer respectivement la contamination protéique et phénolique. L'échantillon présentait des ratios de 1,91 et 2,12, soit une bonne pureté.

Le séquençage des acides nucléiques était ensuite réalisé grâce à un séquenceur Illumina HiSeq4000 qui a permis d'obtenir un fichier informatique comprenant 120 millions de séquences d'une longueur de 100 bases. Afin de simplifier l'analyse bioinformatique, un échantillon de dix millions de séquences, représentatif de l'ensemble du transcriptome, a servi de base de travail.

- *Analyse bioinformatique*

L'analyse bioinformatique a été réalisée grâce à la plateforme Galaxy, développée par le département de biologie de l'Université Johns Hopkins et disponible à l'Institut Pasteur.

- *Trimming des séquences*

L'analyse informatique a débuté par le contrôle de la qualité des séquences grâce à un logiciel appelé *FastQC* permettant de retirer les séquences de mauvaise qualité qui sont déterminées à partir du score de *Phred*. D'autre part, les extrémités des séquences, généralement de mauvaise qualité du fait de la répétition aberrante de bases GC imputable à la technique de séquençage, sont également retirées. Les 12 premières et les 3 dernières bases ont ainsi été supprimées ce qui a permis l'obtention de séquences de 85 nucléotides.

Dans un second temps, le programme *Alien Trimmer*, a permis l'élimination des séquences aberrantes telles que les homopolymères : les séquences avaient ainsi une longueur comprise entre 50 et, pour la majorité, 85 nucléotides. Bien que les séquences aient été retravaillées, elles présentaient dans l'ensemble un pourcentage élevé de bases GC dû à la présence importante d'ARN ribosomique de souris, de nature, riches en bases GC.

□ Mapping des séquences

Compte tenu du choix d'extraire l'ensemble des ARN de l'échantillon, la majorité des séquences correspondaient à de l'ARN de souris et de bactéries. Un programme de *mapping*, *Bowtie2*, était utilisé afin de comparer les séquences de l'échantillon au génome de souris de référence (*Genome reference Consortium Mouse Build 38*) et ainsi éliminer toutes les séquences ayant un bon taux d'alignement avec le génome de la souris : soit 72,63% des séquences.

□ Assemblage

Une fois les séquences du génome de la souris de référence éliminées, les séquences restantes étaient accolées afin d'obtenir des séquences plus longues. Ces dernières présentaient l'avantage d'augmenter la probabilité de correspondance avec le génome d'un potentiel virus et de réduire le nombre total de séquences à comparer avec les banques de données. Le programme *clc assembler* a permis ensuite d'accoler les séquences, non retrouvées au sein du génome de référence, par le chevauchement de leur extrémité : les séquences ayant été alignées sont appelées *contigs* tandis que les autres constituent des *singletons*. Le logiciel a permis l'obtention de deux fichiers d'environ 15 000 contigs contre 710 000 singletons.

□ Basic local Alignment Search tool (BLAST)

L'analyse bioinformatique s'est terminée par la comparaison des *contigs* et des *singletons* obtenus à l'étape d'assemblage aux séquences d'une base de données.

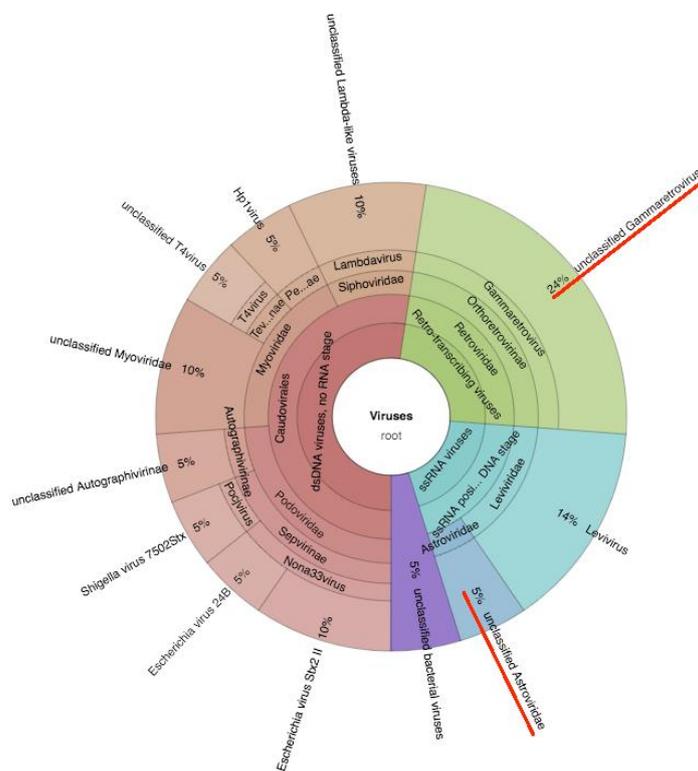
Etude des contigs

Les *contigs* ont été alignés à la banque nucléotidique *RefSeq* permettant d'obtenir plus de 15 000 séquences parmi lesquelles étaient conservées celles qui présentaient un fort degré d'homologie. Après élimination des séquences de phages, de bactéries et conservation des séquences de virus pathogènes chez la souris, le programme a mis en évidence des séquences d'astrovirus et de gammarétrovirus. Le logiciel *rankoptimizer* du logiciel *Krona* a donné les résultats du BLAST sous forme de graphique ci-dessous (Figure 2).

A ce stade, l'hypothèse d'un astrovirus a été retenue pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les astrovirus sont connus pour leur tropisme digestif et provoquent des gastroentérites chez les mammifères dont l'Homme (Donato et Vijaykrishna, 2017). De plus, les *contigs* alignés sur le génome de l'astrovirus couvrent 96% du génome de référence, traduisant ainsi une charge virale élevée. En revanche, les gammarétrovirus sont connus pour avoir intégré le génome de la souris depuis plusieurs millions d'année (Bamunusinghe *et al.*, 2016) et pourraient avoir ici une origine endogène (Kozak, 2014). A l'inverse, la possibilité qu'ils aient une origine exogène, c'est-à-dire que l'individu ait été infecté récemment, reste possible. Considérant l'incertitude de leur origine, le faible taux d'alignements de leurs séquences et la connaissance d'infections virales de types *Murine Leukemia Virus* fréquentes en élevage l'hypothèse d'un gammarétrovirus causal de l'affection a été exclue.

Figure 2 : Résultats d'alignements de séquences sur les contigs lors de l'étude préliminaire (Bach, 2017).

Résultats du programme d'alignement de séquences nucléotidiques BLAST sur les contigs réalisés en 2017 pendant le stage de Noémie Bach à l'Institut Pasteur. Le programme comparait des séquences d'acides nucléiques d'intérêt à une banque nucléotidique de référence. Pour les contigs, la banque *RefSeq* a été utilisée. Parmi tous les contigs, 24% des séquences correspondaient à des gammarétrovirus et 5% à des astrovirus.



Etude des singletons

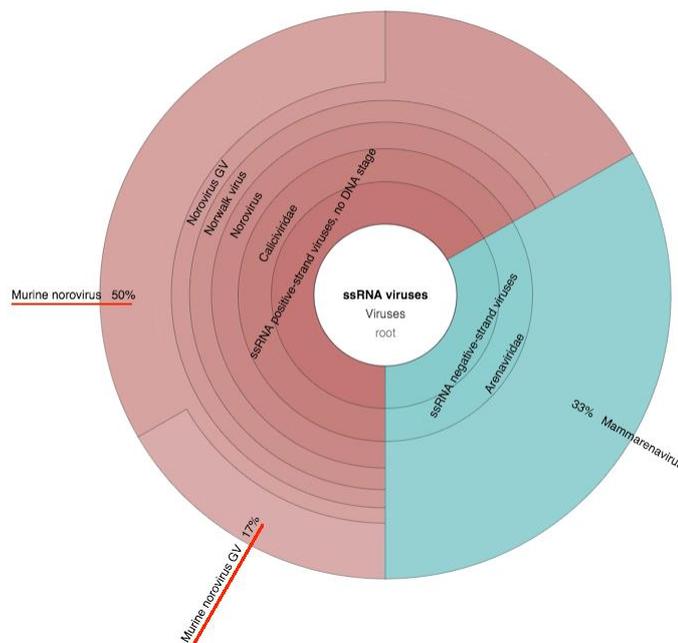
Concernant les *singletons*, les séquences étaient alignées sur la banque *Genbank viruses*, base de données réduite aux séquences virales mais également sur *Genbank total*, banque de données plus complète afin de vérifier qu'il n'existait pas un degré d'homologie plus important avec d'autres agents pathogènes non viraux. Seuls les *singletons* alignés sur les séquences des deux banques de données étaient retenus : soit 415. Une majorité correspondait à des séquences de rétrovirus, éliminée pour les raisons évoquées ci-dessus. Sur les quatre autres types de virus correspondants, trois étaient des faux positifs fréquents dus à leur proximité avec des séquences de mammifères (*mammarenavirus*, *alphaherpesvirus*, *vacciniavirus*).

Ainsi, parmi les *singletons*, seul le type norovirus était envisagé pour plusieurs raisons. Dans un premier temps, les norovirus ont un tropisme pour le système digestif et sont les plus fréquents lors de gastroentérites aiguës décrites chez l'homme (Bartnicki *et al.*, 2017). Par ailleurs, la prévalence des norovirus en élevage de recherche biomédicale est élevée (Karst *et al.*, 2015) et tolérée du fait de la difficulté et du coût d'élimination élevé (Kastenmayer *et al.*, 2008). Cependant, les infections à norovirus étant généralement asymptomatiques (Barron *et al.*, 2011), il est peu probable que ces virus seuls soient responsables de cette affection. Enfin, l'analyse révèle que seulement quatre

singletons s'alignaient sur le génome de norovirus des banques de données ce qui témoignait d'une faible charge virale dans l'échantillon (Figure 3).

Figure 3 : Résultats d'alignements de séquences sur les singletons (Bach, 2017).

Résultats du programme d'alignement de séquences nucléotidiques BLAST sur les singletons réalisés en 2017 pendant le stage de Noémie Bach à l'Institut Pasteur. Le programme comparait des séquences d'acides nucléiques d'intérêt à une banque nucléotidique de référence. Pour les singletons, les banques *GenBank viral* et *Genbank all* étaient utilisées. Parmi tous les singletons, 67% des séquences correspondaient à des norovirus.



- *Confirmation de la présence des astrovirus et norovirus par RT-qPCR*

L'identification de ces agents pathogènes par NGS ne constituait pas une certitude compte tenu d'une éventuelle contamination lors des étapes intermédiaires de construction des banques. Cette identification devait ainsi être vérifiée par la mise en évidence de ces agents au sein de l'échantillon de départ comme évoqué précédemment.

- Intérêt de la RT-qPCR

La RT-qPCR constituait une méthode de choix dans cette étude préliminaire car elle permettait à la fois de mettre en évidence les virus identifiés par NGS et de les quantifier pour estimer leur charge virale. Cette estimation est obtenue par la comparaison de la quantité d'ADN amplifié à celle des gènes de ménage qui étaient exprimés en grande quantité. Elle permet de déterminer la proportion de l'agent pathogène considéré. Enfin, cette méthode donne la possibilité de déduire le nombre de copies d'ARN de départ comme nous le verrons ci-dessous.

- Etape de rétrotranscription

D'un point de vue technique, cette PCR quantitative est précédée d'une étape de RT permettant de synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'un ARN extrait de l'échantillon. Pour

réaliser cette étape, les ARN extraits sont mélangés avec des désoxyribonucléotides libres (dNTP), des amorces à même de s'hybrider sur un brin d'ARN et une enzyme, appelée *reverse transcriptase*, permettant de constituer un brin d'ADNc à partir du brin d'ARN.

Pour cette étude préliminaire, les amorces utilisées étaient composées de six nucléotides aléatoires, encore appelés *random hexamers*, capables de s'hybrider de façon non spécifique sur plusieurs régions d'un brin d'ARN assurant ainsi une polymérisation en ADNc. Ce mélange est ensuite déposé dans un thermocycleur grâce auquel on obtient un ADNc simple brin de la séquence d'ARN d'intérêt.

A ce stade un nouveau contrôle était nécessaire afin de garantir que les futurs amplicons de qPCR étaient bien issus de l'amplification des ADNc d'intérêt et non d'ADN résiduel malgré l'utilisation de DNAses pendant l'étape d'extraction. Ainsi, un tube appelé « RT- » dans lequel la reverse transcriptase n'était pas introduite était utilisé comme contrôle négatif : il ne devait pas contenir d'ADN à la fin de la qPCR.

Etape de qPCR

Cette étape consiste à amplifier l'ADNc obtenu après l'étape de RT et à quantifier le nombre d'amplicons synthétisés à la fin de chaque cycle grâce à un système de mesure optique.

D'un point de vue théorique, l'étape de qPCR se décompose en trois étapes. Une première étape de chauffage dans le but d'activer une ADN polymérase, molécule qui résiste à des températures élevées et dont le rôle est de polymériser le brin d'ADNc. La seconde étape va permettre l'amplification de l'ADN grâce à 45 cycles. Chaque cycle est divisé en trois phases : une phase de séparation des brins d'ADN à 95°C pendant 20 à 30 secondes, une 2e phase d'hybridation des amorces de 10 secondes à une température dépendante des amorces utilisées, et enfin une 3e phase d'élongation par la ADN polymérase de 30 secondes à 72°C.

A la fin de chaque cycle, une mesure de fluorescence permet de déterminer la quantité d'ADN qui est en principe doublée. Cependant, le système de lecture de fluorescence n'est sensible qu'après un seuil de détection donné, généralement atteint après un certain nombre de cycles. Cette première mesure de fluorescence correspond au cycle seuil ou *cycle threshold* (Ct), c'est-à-dire au nombre de cycles nécessaires pour détecter la fluorescence. Cette valeur permettra par la suite de déterminer la quantité d'ADN présente dans l'échantillon de départ.

Pour cette étude préliminaire, les ADN à amplifier sont mélangés avec plusieurs réactifs. Tout d'abord, des dNTP libres et une ADN polymérase. Ensuite, un composé appelé *SYBR green* qui s'intercale entre les bases d'ADN et permet ainsi d'émettre une fluorescence au fur et à mesure de la polymérisation du brin complémentaire. Enfin, un couple d'amorces spécifiques pour chaque séquence à amplifier. Huit couples d'amorces étaient utilisés : trois couples de gènes de souris (*ACTB1 et 2, GAPDH*) utilisés à la fois pour le rôle de témoins positifs et pour normaliser les futurs résultats d'amplification, deux couples pour les norovirus (MuNoro 1 et 2) et trois pour les astrovirus (MuAstro 1 à 3). Les caractéristiques des amorces sont disponibles dans le tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques des couples d'amorces utilisées en RT-qPCR pour la détection des séquences obtenues grâce à l'analyse bioinformatique (Bach, 2017).

Amorces des gènes ACTB1, GAPDH, MuNoro1 et 2, MuAstro 1, 2 et 3 utilisées lors de l'étude préliminaire de l'Institut Pasteur. Les amorces des gènes de ménage, MuACTB et MuGAPDH, amplifient les séquences des gènes codant les protéines d'actine ACTB1 et ACTB2, et l'enzyme GAPDH impliquée dans la glycolyse. Les amorces du norovirus murin, nommés MuNoro 1 à 2, amplifient respectivement une protéine de la capsid et une polyprotéine. Et les amorces de l'astrovirus murin, astro 1 et 2, amplifient une protéine de la capsid, une polymérase et une protéine non structurale. Pour chaque amorce, la séquence et la taille de l'amplicon attendu sont indiquées.

Amorce	Organisme ciblé	Cible	Séquence de l'amorce / Taille de l'amplicon attendu
MuACTB1	Souris	ACTB1	Fw : AGTGTGACGTTGACATCCGT Rv : TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA 120
MuACTB2	Souris	ACTB2	Fw : TTGCTGACAGGATGCAGAAG Rv : ACATCTGCTGGAAGGTGGAC 140
MuGAPDH	Norovirus murin	GAPDH	Fw : AAGGTCATCCCAGAGCTGAA Rv : CTGCTTCACCACCTTCTTGA 140
MuNoro1	Norovirus murin	Capsid	Fw : TCTTTTGTGGTCTCTGGCCG Rv : TGTTGTGCCAAGGAGGGTTC 246
MuNoro2	Norovirus murin	Polyprotéine	Fw : TGGGAACCAGCCTATCTTGG Rv : CTGGTGTCTTGTCCAGGCT 230
MuAstro1	Astrovirus murin	Capsid	Fw : ACCCCCACTGAAAACCATCATT Rv : AGAGATCGCCGTCTAACGGAT 273
MuAstro2	Astrovirus murin	RdRp	Fw : GGAGTTTGACTGGACACGCT Rv : TCGATATAGCGGGGAGGTAGC 372
MuAstro3	Astrovirus murin	Protéine non structurale	Fw : CATCTTTGCGATCAGAGCCG Rv : ATCTCTCGACCCATTGCTGC 247

Réalisation de la qPCR

Une fois le mélange des réactifs terminés, une plaque de qPCR était préparée selon un schéma conçu pour 24 puits afin de détecter la présence des séquences de norovirus et d'astrovirus issues de l'analyse bioinformatique.

Dans un premier temps, huit puits étaient remplis, un pour chaque couple d'amorces, par l'ADN issu de l'étape de RT et les réactifs nécessaires au déroulement de l'expérience. Ensuite, huit autres puits contenant le mélange du tube « RT- », un couple d'amorces pour chaque puits et les réactifs nécessaires, servaient de contrôles négatifs afin d'avoir la certitude que les futurs amplicons correspondaient bien à nos séquences d'intérêt. Enfin, pour garantir l'absence de contamination, huit puits *no template control* (NTC) contenaient seulement les réactifs et chacun des couples d'amorces sans séquences d'ADNc.

Les résultats de cette RT-qPCR sont fournis dans le tableau 3. Dans un premier temps, on obtient une valeur de cycle seuil pour l'ensemble des couples d'amorces ce qui permet de tirer plusieurs conclusions. En premier lieu, les valeurs de Ct des gènes de ménage, comprises entre 15 et 17, témoignaient du bon fonctionnement de la réaction de qPCR.

D'autre part, ces résultats ont montré que les deux types de virus étaient présents dans l'échantillon. On peut également noter que les valeurs de Ct étaient plus basses pour l'astrovirus indiquant une

charge virale plus élevée que pour les norovirus. Dans un second temps, l'absence de détection dans les puits « RT- » des deux types de virus atteste que les amplicons étaient bien issus des séquences polymérisées pendant l'étape de RT. On note néanmoins que les puits des gènes de ménage contenaient encore de l'ADN malgré le traitement par des DNases pendant la phase d'extraction. Enfin, l'absence de détection dans les puits NTC prouve que ce sont bien les séquences des deux virus qui ont été amplifiées.

Tableau 3 : Valeur du cycle seuil à partir de l'échantillon de départ pour chaque couple d'amorces.

Valeurs de Ct pour chaque couple d'amorces sur les échantillons issus du souriceau. Les valeurs sont données dans la colonne « cDNA ». Les valeurs de Ct pour les couples d'amorces des astrovirus sont du même ordre de grandeur que pour les gènes de ménage. Les norovirus sont également présents dans l'échantillon mais les valeurs de Ct sont environ deux fois supérieures à celle des gènes de ménage. Les puits RT- des virus et l'ensemble des puits NTC ne contiennent pas d'ADN. Les puits RT- des gènes de ménage détectent de l'ADN du fait de leur forte concentration initiale et ce malgré les DNases utilisées.

Système	cDNA	RT-	NTC
MuACTB1	15,7	33,6	Pas de détection
MuACTB2	15,6	29,7	Pas de détection
MuGAPDH	17,3	26,8	Pas de détection
MuNoro1	29,9	Pas de détection	Pas de détection
MuNoro2	30,0	Pas de détection	Pas de détection
MuAstro1	18,4	Pas de détection	Pas de détection
MuAstro2	17,1	Pas de détection	Pas de détection
MuAstro3	20,2	Pas de détection	Pas de détection

- *Confirmation de la séquence ou des séquences obtenues : électrophorèse et séquençage de Sanger*

- Electrophorèse des amplicons

Malgré les précédents contrôles, d'autres vérifications étaient nécessaires pour obtenir la certitude que les amplicons obtenus étaient bien ceux attendus. Ainsi, une fois la qPCR terminée, une électrophorèse sur gel d'agarose 2% était réalisée à partir des produits de la qPCR et permettait de constater que la taille de chaque amplicon était bien celle attendue (Figure 4).

- Purification et dosage des amplicons

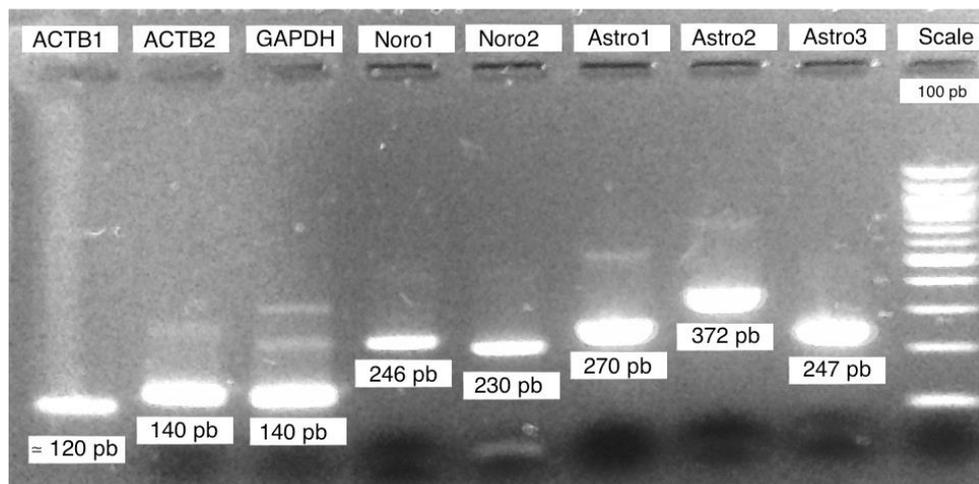
L'étape d'électrophorèse ayant permis de séparer les produits de qPCR des dimères d'amorces, les amplicons pouvaient être purifiés en découpant les bandes puis en les diluant dans une solution tampon. Une fois dilués, la solution contenant les amplicons était versée dans un filtre de silice qui retient les amplicons. Plusieurs rinçages avec des solvants de polarité différente suivis d'étape de centrifugation permettaient d'éliminer les éléments non désirés et d'isoler l'ADN dans une solution aqueuse.

Une fois isolé, une partie de l'ADN était envoyée pour réaliser un séquençage de Sanger et le reste était utilisé pour effectuer un dosage des amplicons. L'intérêt du dosage des amplicons est de déterminer la concentration en ADN après amplification. Cette concentration sera ensuite utilisée

pour construire les gammes de dilutions. Un kit *Invitrogen QuantIT DNA HS* était utilisé pour le dosage : il contenait un marqueur fluorescent capable de se fixer à l'ADN permettant par la suite une mesure de fluorescence à l'aide d'un appareil de lecture *Qubit 3*.

Figure 4 : Résultat d'électrophorèse des amplicons issus de la qPCR sur l'échantillon de départ (Bach, 2017).

Résultats d'électrophorèse des amplicons issus de la qPCR sur l'échantillon de départ. Ce gel montre que tous les amplicons issus des RT-qPCR sont à la taille attendue. Ces données ont servi à vérifier les produits de qPCR.



□ Séquençage de Sanger

L'autre partie des produits de qPCR était séquencée selon la méthode de Sanger par le laboratoire Eurofins. L'intérêt de ce séquençage était de confirmer que la qPCR avait amplifié les séquences attendues. Une fois les séquences obtenues, un BLAST était de nouveau réalisé sur une banque totale pour comparer les séquences amplifiées aux séquences théoriquement attendues. Dans cette étude préliminaire, le séquençage confirmait les résultats de qPCR.

• *Construction des gammes de dilutions*

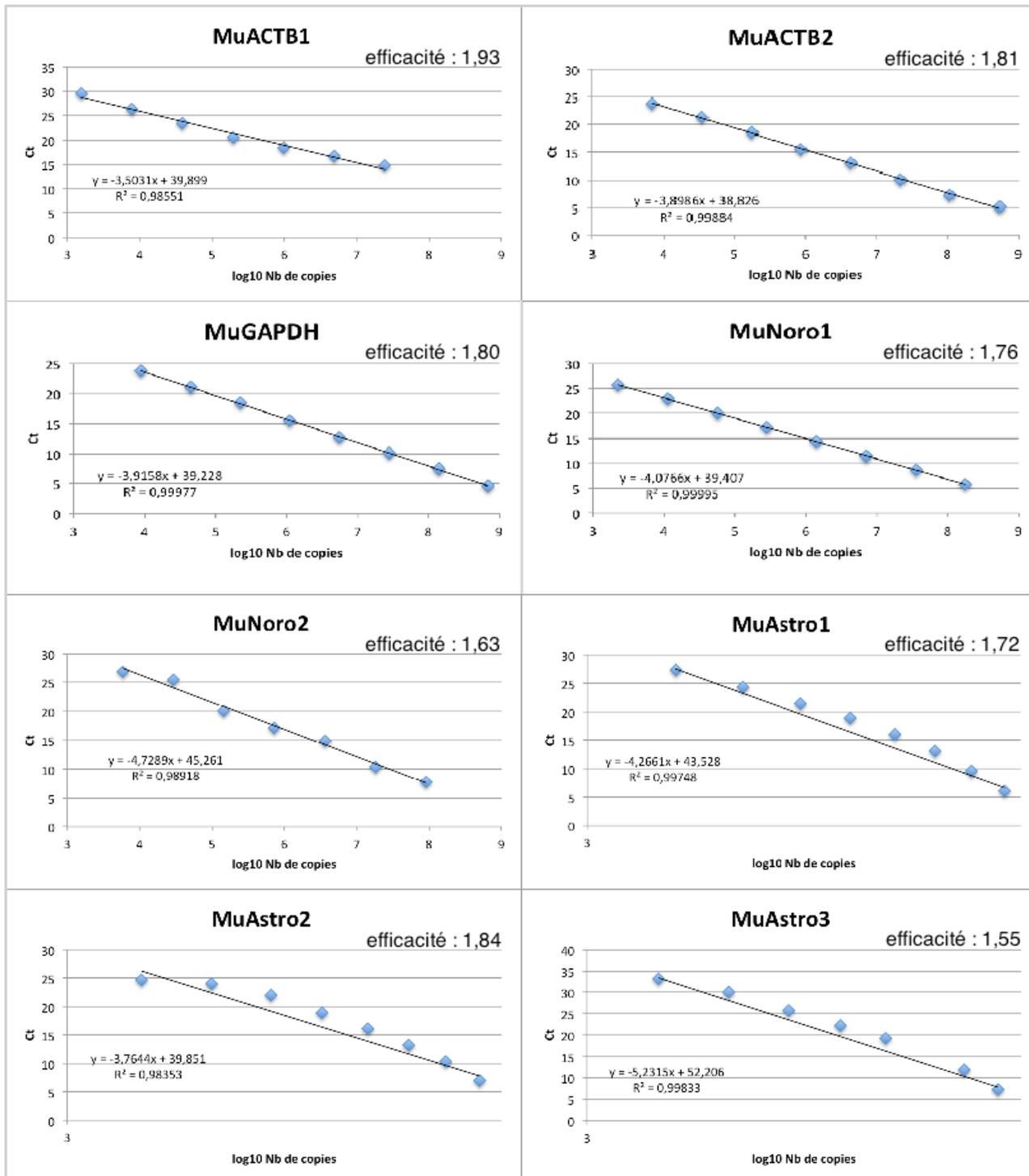
Les gammes de dilutions ont pour objectif de quantifier le nombre de copies d'ARN dans l'échantillon de départ. Les gammes sont constituées pour chaque couple d'amorces à partir de dilutions en cascade d'un échantillon positif appelé le calibrateur.

Après l'étape de qPCR, la valeur de Ct obtenue était comparée au nombre de copies présentes dans l'échantillon afin de construire une régression linéaire. Un coefficient d'efficacité peut ainsi être déduit de la régression linéaire. Il est ensuite utilisé pour extrapoler les quantités de virus initiales selon une méthode de quantification absolue (Figure 5).

Par une modélisation mathématique, la quantité d'astrovirus et de norovirus était obtenue et comparée à la quantité de gènes de ménage. Chez le souriceau, les astrovirus étaient en quantité similaire aux gènes de ménage ce qui traduisait une charge virale élevée. Néanmoins, la charge virale en norovirus était plus faible d'un facteur 1000. Afin de confirmer les résultats obtenus à partir de l'échantillon de départ, une RT-qPCR était réalisée avec chacun des huit couples d'amorces sur cinq autres femelles mortes d'ENA et un groupe témoin de six femelles saines.

Figure 5 : Résultats des gammes de dilution à partir de l'échantillon du souriceau de départ pour chaque couple d'amorces (Bach, 2017).

Les couples d'amorces des gènes de ménage montrent une bonne efficacité qui se rapproche de deux. L'efficacité des couples d'amorces pour MuNoro1 est bonne et celle de MuNoro2 est acceptable. L'efficacité de MuAstro 1 et 2 est bonne, celle de MuAstro3 est la plus basse.



- *Conclusion de l'étude préliminaire*

Malgré le petit échantillon étudié, une tendance peut être envisagée à l'issue des analyses réalisées par Noémie Bach à l'Institut Pasteur. Toutes les souris étaient positives à l'un ou l'autre des virus étudiés. Le souriceau et sa mère, morts d'ENA, étaient positifs au deux virus, contre une seule souris contrôle.

L'astrovirus était présent chez deux souris de chaque groupe. Chez les souris mortes d'ENA, la charge virale en astrovirus était comparable à celle des gènes de ménage, soit 1000 à 10 000 fois plus élevée que chez les souris contrôles.

Le norovirus était lui présent chez cinq souris mortes d'ENA et deux souris contrôles. Chez les souris mortes d'ENA, le norovirus était présent dans des quantités similaires aux gènes de ménage alors qu'il l'était 1000 fois moins présent chez les souris contrôles.

Dès lors, l'implication d'un astrovirus semblait être la piste à privilégier. Néanmoins, l'exclusion à ce stade du rôle d'un norovirus semblait prématurée et l'éventualité d'un processus multifactoriel était à considérer. Ainsi l'hypothèse d'une co-infection par ces deux types de virus dans un contexte d'affaiblissement dû à d'une demande énergétique élevée était envisagée. Afin de confirmer ces résultats préliminaires, une étude sur un plus grand nombre d'échantillons a été développée.

3. Etat des connaissances sur les virus murins compatibles

Suite aux résultats obtenus à partir de l'étude préliminaire réalisée par Noémie Bach à l'Institut Pasteur, l'hypothèse d'une infection virale à astrovirus ou à norovirus était à étudier.

Les hypothèses virales évoquées étaient d'autant plus cohérentes que les astrovirus et les norovirus ont un tropisme digestif chez l'Homme. La présence d'astrovirus dans les selles de souris de laboratoire a également été documentée au cours d'une étude consacrée à la description de la flore fécale virale chez la souris de laboratoire (Phan *et al.*, 2011). D'autre part, la présence de norovirus en animalerie de recherche est connue et associée à une éradication complexe et coûteuse (Kastenmayer *et al.*, 2008).

Les caractéristiques de chacun de ces virus ont été développées ci-dessous.

A. Astrovirus

Les astrovirus ont été décrits pour la première fois en 1975 chez un enfant atteint de diarrhée (Madeley et Cosgrove, 1975). Les astrovirus font également l'objet de description chez les oiseaux et plusieurs espèces de mammifères telles que les carnivores domestiques, le vison, le porc, le bétail, les cervidés, les chauves-souris ou les rongeurs comme la souris de laboratoire (Blomström *et al.*, 2010; Reuter *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2011).

Chez la souris de laboratoire, l'astrovirus murin (AVM) a été isolé pour la première fois à partir d'intestin de souris de type *nude* et de type *NMRI* en 1985 (Kjeldsberg et Hem).

a. Caractéristiques de l'astrovirus murin

Les astrovirus appartiennent à la famille des *Astroviridae* qui comporte deux genres affectant respectivement les oiseaux et les mammifères : les *Avastrovirus* et les *Mamastrovirus* (Figure 6).

Les astrovirus sont des virus nus d'environ 28 nm dont la forme en microscopie électronique rappelle celle d'une étoile. Le génome est constitué d'un ARN monocaténaire à polarité positive compris entre 6,1 à 7,3 kb.

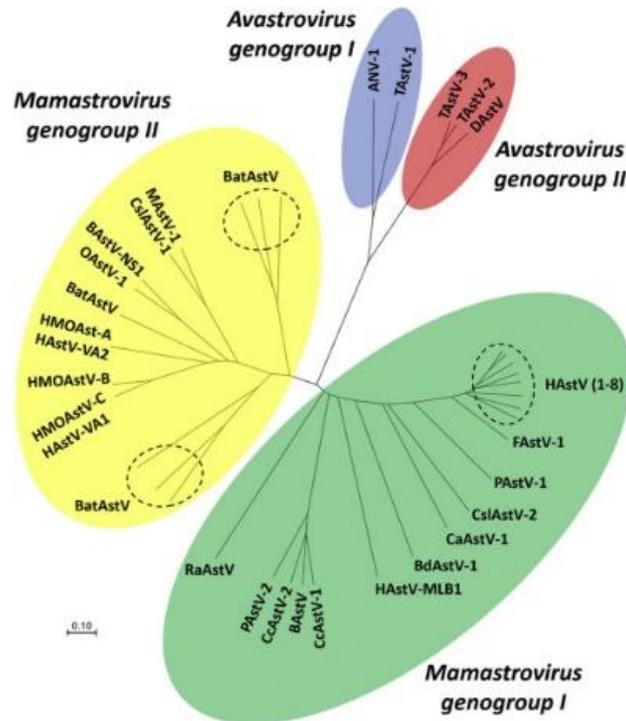
Le génome des AVM a été caractérisé à partir de selles de souris *Mus musculus* sauvages en provenance de Californie et de Virginie (Phan *et al.*, 2011). Il comporte trois phases ouvertes de lecture ou *open reading frame* (ORF) : l'ORF1 code pour des protéines non-structurales impliquées dans les fonctions de transcription et de réplication (Lewis *et al.*, 1994); l'ORF2 et l'ORF3 codent pour des protéines structurales de la capsidie notamment la protéine VP27 dont l'intérêt sera développé ci-dessous (Méndez *et al.*, 2002).

b. Données épidémiologiques

Chez l'Homme, les astrovirus sont la cause la plus fréquente de gastroentérite chez les individus immunodéficients après les rotavirus. Leur proportion serait néanmoins sous-estimée du fait du peu de signes cliniques qu'ils provoquent. Chez la souris de laboratoire, un nombre important d'études fait état d'infections au sein de colonies de souris d'origine commerciale ou issues de structures de recherche biomédicale sur la plupart des continents (Morita *et al.*, 2020; Yokoyama *et al.*, 2012).

Figure 6 : Classification des astrovirus (2019, Wohlgenuth).

Les astrovirus sont répartis en deux genres : les avastrovirus et les mamastrovirus. L'astrovirus murin fait partie du génogroupe II des *mamastrovirus*.



Les infections à AVM concernent des individus de tout âge. *Compton et al* (2017) ont observé que des souriceaux et des adultes de trois et 12 semaines peuvent être infectés à partir d'un environnement contaminé. Ces différentes capacités d'infection des astrovirus sont retrouvées chez l'Homme où des adultes immunocompétents ont été infectés (*Belliot et al.*, 1997), 1997). De plus, des individus immunodéprimés tels que des enfants (*Dennehy et al.*, 2001), des personnes âgées ou gravement malades (*Grohmann et al.*, 1993) sont susceptibles de développer des signes cliniques plus importants.

c. Signes cliniques associés aux astrovirus

Chez la souris de laboratoire, les infections à AVM sont généralement silencieuses et ne s'accompagnent pas de signes cliniques (*Cortez et al.*, 2019). Chez la souris CD1 en lactation et ses souriceaux, des infections chroniques de plus de trois semaines sans signe clinique ni lésion sont décrites (*Compton et al.*, 2017; *Morita et al.*, 2020). D'autres part, des modèles de souris immunodéficientes B6.Rag1 et B6.Stat1 ne présentent pas non plus de signes cliniques (*Yokoyama et al.*, 2012). Néanmoins, des diarrhées associées à une infection à AVM sont décrites (*Kjeldsberg et Hem*, 1985).

Chez l'Homme, les signes cliniques associés à ces astrovirus sont une diarrhée, des vomissements, de la fièvre, une anorexie et une douleur abdominale. Ces signes cliniques s'étendent sur une durée de 2 à 4 jours (*Dennehy et al.*, 2001). D'autre part, des encéphalites et des méningites associées aux astrovirus sont également décrites (*Naccache et al.*, 2015).

D'autres signes cliniques tels que des hépatites sont rapportés chez le canard (Gough *et al.*, 1985) ou des encéphalomyélites chez le vison (Blomström *et al.*, 2010). Chez la dinde, une entérite associée à la présence d'astrovirus est décrite (Jindal *et al.*, 2014).

d. Mécanismes cellulaires

De façon inattendue, les individus infectés ne présentent pas de lésions macroscopiques (Compton *et al.*, 2017) ni de signes d'inflammation ou d'infiltration de cellules immunitaires (Cortez *et al.*, 2019). L'absence de réponse inflammatoire suggère que la diarrhée n'est pas due à une destruction épithéliale ni à un syndrome inflammatoire.

Néanmoins, une étude sur culture cellulaire *in vitro* a montré que l'AVM induit une altération des jonctions serrées et une diminution des fibres d'actine au niveau des cellules épithéliales de l'intestin grêle. Ces deux facteurs combinés conduiraient à augmenter la perméabilité membranaire à l'origine de flux d'agents pathogènes et d'eau. D'autre part, la réplication de l'AVM n'est pas nécessaire à cette augmentation de perméabilité qui serait plutôt provoquée par l'ancrage ou l'entrée du virus dans la cellule (Moser *et al.*, 2007).

e. Lésions histologiques

Aucune étude ne rapporte de lésions histologiques associées à l'AVM. Plusieurs études ont mis en évidence l'AVM au niveau de l'intestin grêle, de la portion proximale du gros intestin, des nœuds lymphatiques mésentériques, de la rate, du foie, des reins ou encore des poumons (Compton *et al.*, 2017; Cortez *et al.*, 2019).

L'utilisation de méthodes d'hybridation *in situ* et de microscopie électronique a permis de localiser l'AVM avec précision au sein de grains de mucine des cellules caliciformes du duodénum et du jéjunum dix jours après infection (Cortez *et al.*, 2019). L'AVM a également été observé en plus faible quantité dans la lumière de l'iléon et au sein du mucus tapissant la paroi du gros intestin proximal.

Chez l'Homme, la souche VA1 de l'astrovirus humain serait aussi capable d'infecter les entérocytes ou encore les cellules souches (Kolawole *et al.*, 2019).

f. Réponse immunitaire à une infection à l'astrovirus murin

L'absence de lésion suppose que la réponse immunitaire face à ces infections à AVM est de faible intensité. Il a été suggéré que l'AVM n'induisait pas de mémoire immunitaire suite à l'observation de plusieurs infections au cours de la vie de certains individus (Schmidt *et al.*, 2017). En revanche, une étude sur modèles murins immunodéficients a permis de mettre en évidence le rôle de l'immunité adaptative dans le contrôle de la réplication de l'AVM (Yokoyama *et al.*, 2012).

L'immunité innée est également impliquée dans le contrôle des infections à AVM. Des souris dépourvues du gène *Stat1*, responsable de la signalisation cellulaire des interférons (IFN) de type I et II, sont incapables de contrôler la réplication et l'excrétion de l'AVM (Yokoyama *et al.*, 2012). D'autre part, *Stat1* est nécessaire à la synthèse d'oxyde nitrique.

Récemment, il a été découvert qu'une infection à AVM compensait le défaut d'immunité adaptative en augmentant la sécrétion d'IFN γ au niveau de la muqueuse intestinale et ainsi stimulerait la réponse immunitaire innée (Ingle *et al.*, 2019). Cette augmentation de l'IFN γ permettrait d'éviter l'apparition d'effets indésirables inflammatoires.

g. Transmission de l'astrovirus murin

Plusieurs hypothèses ont été émises quant à la transmission du virus au sein d'une animalerie. Dans un premier temps, une transmission verticale est peu probable du fait de l'absence d'AVM dans le système digestif de souriceaux cinq jours après la mise-bas. De plus, l'AVM a été détecté dans les selles de 97% des souriceaux âgés de trois à neuf semaines et issus d'une mère infectée et que les selles de souris étaient contaminantes plus de trois semaines après infection (Compton *et al.*, 2017). Une transmission horizontale est donc plus probable. D'autre part, des souris immunodéficientes excrètent l'AVM sur une longue période et la durée d'excrétion est plus longue que chez des souriceaux. Ces deux paramètres favoriseraient la transmission du virus à des souris encore naïves (Schmidt *et al.*, 2017).

h. Méthodes de détection de l'astrovirus murin

L'absence de signes cliniques et de lésions associées à la durée potentiellement longue des infections à AVM a généré des interrogations quant à l'impact de ces infections sur les résultats de recherche. Depuis la découverte des AVM au sein des structures de recherche, plusieurs méthodes de détection ont été développées dans le but d'établir un statut sanitaire au sein de l'établissement.

- *Méthodes de détection directes*

La réalisation de RT-qPCR à partir de selles de souris permet de détecter l'AVM à partir de différents types de prélèvements sur une durée de 3 semaines à deux mois après inoculation du virus. L'utilisation de RT-qPCR à partir d'écouvillons réalisés sur le système d'aération s'est avérée plus rapide et plus sensible que l'utilisation de souris sentinelles (Compton *et al.*, 2017).

- *Méthodes de détection indirectes*

D'autres méthodes de détection ont été développées afin de déterminer le statut d'un individu vis-à-vis de l'AVM ou de l'identifier en dehors des périodes d'excrétion. Ces méthodes ont pour but de diagnostiquer une infection à AVM silencieuse. Un test sérologique réalisé à partir d'anticorps dirigés contre la protéine de la capsid VP27 s'est révélé plus sensible que l'utilisation de souris sentinelles. Des contrôles d'hygiène de routine permettraient d'évaluer le statut sanitaire des animaleries de laboratoire (Schmidt *et al.*, 2017).

B. Norovirus

Les norovirus ont été découverts en 1968 à partir de selles d'Hommes affectés par une épidémie de gastroentérite dans une école de Norwalk aux Etats-Unis. Aujourd'hui, ces norovirus sont la principale cause d'épidémies de gastroentérites aiguës chez l'Homme et sont répartis sur l'ensemble des continents (Koo *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2017).

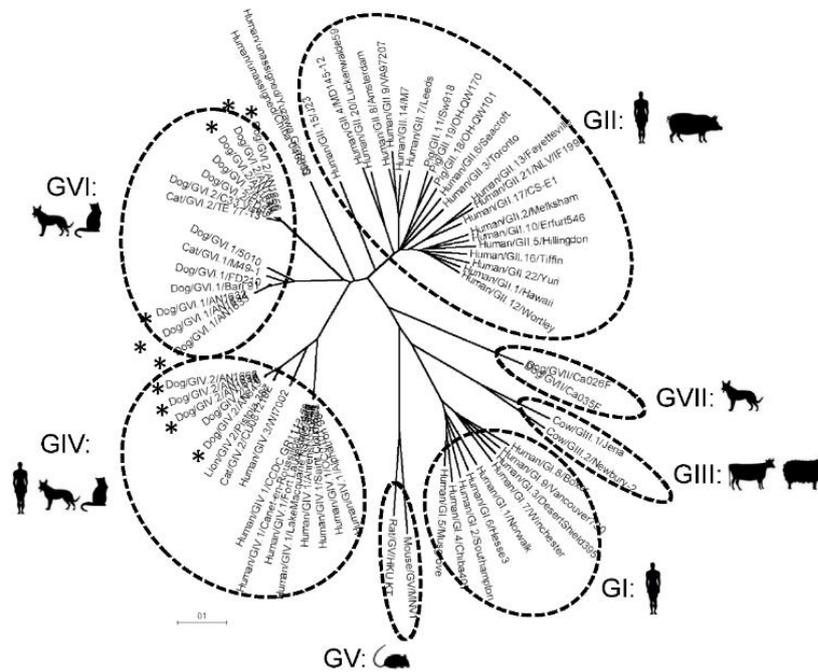
D'autres espèces animales constituent un réservoir pour les norovirus comme les suidés, les bovins ou encore les carnivores domestiques (Liu *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005). Chez la souris, le norovirus murin (NVM) a été découvert en 2003 (Karst *et al.*, 2003) et est aujourd'hui largement identifié dans la plupart des animaleries de recherche du monde (Hsu *et al.*, 2005).

a. Caractéristiques moléculaires des norovirus

Les norovirus appartiennent à la famille des *Caliciviridae* et le NVM appartient au génogroupe V de la classification (Figure 7).

Figure 7 : Classification des norovirus (2019, Ford-Siltz).

Les norovirus font partie de la famille des caliciviridae et sont divisés en sept génogroupes. Le NVM appartient au génogroupe V.



Les NVM sont des virus nus de 27 à 35 nm dont le génome est constitué d'ARN monocaténaire à polarité positive d'environ 7,5 kb. Le génome comprend quatre ORF qui codent respectivement pour les protéines non structurales comme la polymérase, la protéine majeure de la capsid VP1, une protéine structurale mineure VP2 et un facteur de virulence antagoniste à la réponse immunitaire innée (McFadden *et al.*, 2011).

La proximité structurelle du NVM avec des souches humaines et la possibilité de le cultiver *in vitro* sur des cellules dendritiques ou des macrophages de souris a largement contribué à son étude (Wobus *et al.*, 2004). Plusieurs souches de NVM ont permis d'étudier les mécanismes pathogènes des norovirus, notamment le norovirus murin 1 (MNV-1), les souches CR6 et CW3.

b. Données épidémiologiques

Chez l'Homme, les norovirus affectent des individus de tout âge mais des complications peuvent apparaître chez des individus immunodéficients. La prévalence des épidémies à norovirus est de 20% dans le monde. Ces épidémies auraient provoqué 200 000 morts/an en 2015 (Lopman *et al.*, 2016).

En ce qui concerne les animaleries de recherche, le NVM représentait en 2013 le virus le plus retrouvé chez la souris de laboratoires au sein des structures japonaises, à hauteur de 12 %. En 2022, la prévalence du NVM atteint jusqu'à 50% des individus dans certaines animaleries (Paik *et al.* 2011 ; Kim *et al.* 2022). Cette forte prévalence en animalerie peut résulter d'une dissémination du NVM à travers les structures de recherche. Les souris dont le système immunitaire est fonctionnel peuvent être porteuses du NVM sans développer de signes cliniques. Cette forte prévalence peut également être biaisée par l'augmentation du nombre de tests diagnostiques réalisés dans les animaleries.

c. Signes cliniques associés aux norovirus

Les infections à NVM chez les souris immunocompétentes sont généralement asymptomatiques (Karst et al. 2003 ; Barron et al. 2011). Néanmoins, les connaissances sur le NVM ont été élargies grâce chez certains modèles murins génétiquement modifiés. Ces modèles comportent en particulier des souris *RAG*^{-/-} et *STAT1*^{-/-} dont les gènes, respectivement impliqués dans l'immunité adaptative et l'immunité innée, sont inactivés. L'inactivation du gène *STAT1* inhibe notamment la réponse IFN.

Chez les souris immunodéficientes *RAG/STAT1*^{-/-} infectées par le NVM par voie intracérébrale, des morts soudaines sont décrites et sont précédées d'une encéphalite, d'une méningite, d'une hépatite ou encore d'une pneumonie (Karst et al., 2003). D'autre part, chez les souris *STAT1*^{-/-}, une diarrhée sévère, une distension abdominale et une perte de poids sont rapportées (Mumphrey et al. 2007 ; Karst et al. 2003). Plus encore, des diarrhées auto-résolutives chez des nouveau-nés *BALB/c* ont été associées à une souche de NVM (Roth et al., 2020).

Chez l'Homme, les norovirus sont à l'origine de fièvre, de nausées, de vomissements, de diarrhée et de douleurs abdominales après 24 heures d'incubation (Graham et al., 1994). Chez certains individus immunodéprimés, une mort soudaine est possible.

d. Mécanismes cellulaires

Chez la souris immunodéficiente *RAG/STAT1*^{-/-} dépourvues d'immunité innée et adaptative, des lésions de vascularite au niveau de l'encéphale, de pneumonie ou encore une destruction du parenchyme hépatique et splénique ont été décrites (Karst et al., 2003). Chez la souris *Ldlr*^{-/-}, nourrie avec un régime riche en lipides, le NVM est associé à une augmentation des lésions d'athérosclérose au niveau du sinus aortique, bien que la mutation sur le gène *Ldlr* les prédispose à ces lésions (Paik et al., 2011). Aucune étude ne décrit de lésion intestinale macroscopique.

Néanmoins, plusieurs organes cibles du NVM sont décrits chez la souris *STAT1*^{-/-} et les souris de type sauvage 24 heures après l'inoculation par voie orale : l'intestin, le caecum, le foie et la rate (Karst et al., 2003) ou encore les poumons (Mumphrey et al., 2007). Au niveau du colon et du caecum, le NVM peut persister et devenir une source d'excrétion. D'autre part, les souris *STAT1*^{-/-} présentent un taux élevé de NVM et des lésions tissulaires trois à sept jours après l'infection (Karst et al., 2003).

e. Lésions histologiques

Certaines études rapportent l'absence de rupture de la barrière intestinale ou d'infiltration de cellules inflammatoires autour des cellules infectées (Wilen et al., 2018). A l'inverse, d'autres études rapportent une inflammation modérée de la lamina propria de l'intestin grêle associée à une apoptose des cellules épithéliales intestinales chez la souris de type sauvage (Mumphrey et al., 2007). Un afflux de granulocytes neutrophiles est également observé.

Des traces de NVM ont été mises en évidence au niveau de la zone des lymphocytes B des plaques de Peyer chez la souris *STAT1*^{-/-} et *IL10*^{-/-} (Basic et al., 2014). Lors d'infection par voie orale, les NVM transitent par des entérocytes spécifiques appelés « microfold cells » (Cellules M), présents au niveau des plaques de Peyer et des follicules lymphoïdes (Gonzalez-Hernandez et al., 2014). Ils atteignent ensuite les cellules *Tuft* de la paroi intestinale qui serviraient de réservoir lors d'échappement à la réponse immunitaire.

f. Réponse immunitaire face à une infection à norovirus murin

L'absence de lésion et d'inflammation chez les souris de type sauvage infectées a suscité des interrogations sur la prise en charge du NVM par le système immunitaire.

- *Rôle essentiel des interférons de l'immunité innée dans le contrôle de l'infection à norovirus murin*

Chez la souris, l'immunité innée joue un rôle essentiel lors d'infection par le NVM : l'inoculation intracérébrale et intranasale de NVM chez les souris *RAG/STAT1^{-/-}*, dépourvues de toute immunité, engendre une mort soudaine (Karst *et al.*, 2003). De plus, la mortalité est supérieure chez des souris dépourvues de récepteurs pour les IFN- α et β et IFN γ par rapport à des souris contrôles (non mutantes) (Karst *et al.*, 2003). De plus, l'inoculation de NVM chez la souris *RAG^{-/-}*, dépourvue d'immunité adaptative, n'est pas létale. Contrairement à l'immunité adaptative, l'immunité innée médiée par les IFN est primordiale pour prévenir la mort des souris lors d'inoculation de NVM.

D'autre part, l'injection d'IFN γ 24 heures après infection par voie orale inhibe la souche du NVM CR6, responsable d'infections intestinales chroniques non létales (Nice *et al.*, 2015). Ce résultat suggère que la réponse à IFN γ prévient toutes infections chroniques à NVM CR6. De plus, l'inoculation 15 jours plus tard du NVM CR6 à ces mêmes souris n'empêche pas une infection chronique ce qui implique ainsi l'absence de mémoire immunitaire et confirme que la réponse IFN γ est un mécanisme de l'immunité innée. Enfin, le traitement de ces souris infectées par une injection d'IFN γ par voie intrapéritonéale permet une élimination du NVM CR6 des nœuds lymphatiques mésentériques et du côlon (Nice *et al.*, 2015). La réponse immunitaire innée est donc essentielle à la prévention d'une infection chronique et à l'élimination du NVM. La même expérience a été reproduite chez des souris *Ifnar1*, dépourvues de réponse IFN- α et β et des souris *RAG^{-/-}*. L'infection chronique a pu être éliminée ce qui permet de confirmer que la réponse IFN- α et β n'est pas nécessaire à l'élimination du NVM et que l'immunité innée est efficace en l'absence d'immunité adaptative (Nice *et al.*, 2015).

- *Rôle de l'immunité adaptative dans le déterminisme du caractère aigu ou chronique lors d'infection à norovirus murin*

Bien qu'elle n'empêche pas la mort soudaine chez la souris et malgré l'apport d'arguments en faveur de l'absence de rôle de l'immunité adaptative lors d'infections à NVM, une autre étude suggère un rôle dans lors de la phase initiale de l'infection et lors de l'élimination du NVM. Contrairement à des souris de type sauvage, les souris *RAG^{-/-}* sont incapables d'éliminer le NVM lors d'infections généralisées ou localisées dans l'intestin (Chachu *et al.*, 2008). De plus, les cellules de l'immunité adaptative sont généralement nécessaires à l'élimination d'un virus.

L'immunité adaptative participerait à déterminer le caractère aigu ou chronique de l'infection par le biais d'une activation plus ou moins importante des lymphocytes cytotoxiques CD8 $^+$ et CD4 $^+$. Une étude a néanmoins montré que la présentation du NVM par les lymphocytes B aux lymphocytes cytotoxiques CD8 $^+$ était inhibée par la protéine de la capsid VP2, entravant ainsi le contrôle de l'infection dans sa phase initiale (Zhu *et al.*, 2016).

- *Rôle de la protéine CD300ld exprimée dans les cellules Tuft et ciblée par le norovirus murin*

D'un point de vue moléculaire, le NVM cible plusieurs protéines membranaires, dont les immunoglobulines de surface CD300ld et CD300lf (Haga *et al.*, 2016). Elles jouent le rôle de récepteur pour le NVM et sont indispensables au mécanisme d'ancrage nécessaire à l'infection

(Orchard *et al.*, 2016). La protéine CD300lf est exprimée par plusieurs types de cellules hématopoïétiques tels que les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les lymphocytes B connus pour être des cibles du NVM (Borrego, 2013). De plus, certains types cellulaires insensibles au NVM peuvent être infectés après une transfection de la protéine CD300lf (Haga *et al.*, 2016).

Par ailleurs, des cellules épithéliales de l'intestin impliquées dans la réponse immunitaire, les cellules *Tuft*, expriment la protéine CD300lf (Wilén *et al.*, 2018). Ces cellules participent notamment à la réponse immunitaire face à certains parasites : lors d'infections intestinales par des helminthes, les cellules *tuft* produisent l'IL-25 (von Moltke *et al.*, 2016). Elles sont également la cible d'une protéine non structurale du NVM appelée NS1 qui inhibe la réponse IFN λ (Lee *et al.*, 2019).

D'autre part, l'expression du gène *CD300lf* est indispensable à la transmission de NVM CR6 : les souris dont le gène *CD300lf* a été inactivé sont résistantes à la souche CR6 (Graziano *et al.*, 2021; Orchard *et al.*, 2016). A l'inverse, l'expression de CD300lf n'est pas requise lors d'infections par le NVM CW3, responsable d'infections transitoires chez des souris immunocompétentes voire létales chez des souris immunodéficientes, bien qu'elle semble y participer. Néanmoins, chez des souris immunocompétentes dont le gène *CD300lf* au niveau de macrophages et de monocytes a été inactivé, une réduction de la charge virale a été observée.

g. Transmission des norovirus murins

Une transmission horizontale par voie oro-fécale est la plus probable bien qu'une transmission indirecte soit facilitée par la persistance du NVM dans l'environnement. Chez la souris, l'excrétion virale est chronique et le NVM persiste dans le côlon (Hsu *et al.*, 2006). Il peut être détecté jusqu'à 16 semaines après infection (Lee *et al.*, 2011) et l'excrétion dans l'environnement peut atteindre 100 millions de séquences virales par gramme de selles (Arias *et al.*, 2012).

h. Méthodes de détection

Initialement, le diagnostic du norovirus dépendait de son observation par microscopie électronique mais cette méthode était peu rapide, coûteuse et manquait de sensibilité. D'autre part, contrairement aux AVM, la présence de norovirus dans les animaleries de recherche est tolérée du fait de sa difficulté d'élimination. Néanmoins, le potentiel impact sur les résultats de recherche tend à développer des méthodes de détection des NVM.

- ***Méthodes de détection directes***

La RT-qPCR constitue la méthode de référence pour la détection de NVM. Cette méthode est sensible plusieurs semaines après infection et notamment lors d'infections asymptomatiques. Le NVM a été amplifié dans des échantillons de jéjunum, de nœuds lymphatiques mésentériques et de la rate jusqu'à cinq semaines après inoculation virale (Hsu *et al.*, 2005).

- ***Méthodes de détections indirectes***

La détection d'anticorps anti-NVM1 à partir du sérum de souris inoculées par immunofluorescence a montré de bonne sensibilité et spécificité (Hsu *et al.*, 2005). Cette méthode permet l'analyse de 100 prélèvements en même temps et nécessite peu de sérum comparé à une méthode de détection ELISA. Néanmoins, les résultats de cette étude reposent sur un faible nombre d'échantillons et le risque de faux-positifs par réaction croisée avec d'autres agents pathogènes n'est pas exclu.

C. Influence du microbiote intestinal sur les virus entériques

De plus en plus d'études sont consacrées aux interactions entre les agents pathogènes intestinaux et le microbiote intestinal. Les astrovirus et les norovirus subissent également les effets du microbiote.

a. Influence du microbiote intestinal sur les astrovirus

Les entérites virales à AVM sont modulées par le microbiote intestinal comme la plupart des virus (Pfeiffer et Virgin, 2016). Chez l'Homme, les infections à astrovirus sont également facilitées par d'autres agents pathogènes du système digestif. La présence de parasites intestinaux au sein d'une colonie de souris favorise la contamination par d'autres agents pathogènes.

De manière inattendue, une étude montre qu'une infection à AVM induit une réponse à IFN γ qui protège indirectement contre les infections à NVM chez la souris immunodéficiente (Ingle *et al.*, 2019). La réponse immunitaire induite par l'AVM protège également contre d'autres agents pathogènes tels que les *Escherichia coli* entéro-pathogène (Cortez *et al.*, 2019).

b. Influence du microbiote intestinal sur les norovirus

- *Etude in vitro*

Une étude a montré que l'infection de lymphocytes B par le NVM est stimulée par des entérobactéries exprimant des antigènes sanguins qui jouent le rôle de facteurs d'ancrage (Jones *et al.*, 2014). L'utilisation d'antibiotiques réduit la charge bactérienne et inhibe indirectement la réplication virale. Néanmoins, la présentation du NVM par les lymphocytes B aux lymphocytes cytotoxiques CD8+ se produit indépendamment de la flore commensale (Zhu *et al.*, 2016).

- *Etude in vivo*

D'autres études ont été réalisées *in vivo*. L'administration d'antibiotiques chez des souris infectées par le NVM CR6 inhibe spécifiquement la réplication du virus au niveau intestinal mais n'empêche pas sa réplication au niveau systémique (Baldrige *et al.*, 2015). Par ailleurs, ces mêmes entérobactéries empêcheraient toute infection par le norovirus humain chez le cochon gnotobiotique (Lei *et al.*, 2016). Néanmoins, l'étude ne présente pas de contrôle permettant de confirmer ces résultats.

Deuxième partie : étude expérimentale

1. Introduction

Depuis le mois de mars 2016, certaines souris allaitantes de l'animalerie du laboratoire de génétique situé à l'EnvA mouraient de façon soudaine entre la 2^e et la 3^e semaine de lactation. Cette mort brutale ne s'accompagnait généralement d'aucun signe d'appel bien que quelques-unes étaient trouvées moribondes et prostrées. A l'autopsie, elles présentaient systématiquement une distension abdominale causée par une dilatation de l'intestin grêle associée à une nécrose du duodénum, et selon l'évolution de l'ENA, du jéjuno-iléon.

Plusieurs publications décrivent une affection aux signes cliniques et aux lésions similaires chez des souris allaitantes sous différentes appellations. D'autre part, l'étiologie est systématiquement inconnue. Plusieurs hypothèses étaient ainsi évoquées et une origine infectieuse possiblement associée à une composante métabolique semblait être une piste à privilégier. *C. perfringens* est l'agent infectieux le plus souvent mis en avant du fait de son observation dans plusieurs publications (Feinstein *et al.*, 2008; Kunstýř, 1986) et de la mise en évidence de toxine α dans une étude (Krugner-Higby *et al.*, 2006). Néanmoins, *C. perfringens* comporte sept types classés selon six toxinotypes majeurs. Cette caractéristique implique une multitude de signes cliniques et de lésions pour un même agent pathogène, d'autant plus que des toxines mineures participent également à son pouvoir pathogène. Un autre agent était à considérer, *C. piliforme*, également à l'origine d'une mortalité soudaine mais généralement précédée d'une diarrhée profuse chez des souris allaitantes (Uzal *et al.*, 2016).

La première étude préliminaire bactériologique se révélant négative, une recherche d'agent pathogène sans *a priori* à partir d'un souriceau mort d'ENA, a permis d'isoler les séquences d'acides nucléiques de deux virus au tropisme digestif : un astrovirus et un norovirus. Malgré la description fréquente d'infections à AVM et NVM silencieuses chez des individus sains, l'hypothèse d'une co-infection par ces deux types de virus dans un contexte de stress énergétique élevée était envisagée. De plus, les RT-qPCR réalisées pendant cette étude préliminaire avaient permis d'extrapoler la quantité initiale en virus. La quantité en AVM s'était révélée être similaire aux gènes de ménage alors que la quantité en NVM était 1000 fois inférieure.

L'objectif de cette étude était multiple.

Dans un premier temps, une caractérisation épidémiologique de la maladie a permis de tester plusieurs hypothèses grâce à la réalisation d'une base de données conçue à partir des données récoltées quotidiennement dans notre colonie de souris entre janvier 2016 et décembre 2019. Cinq hypothèses ont été testées : deux issues des publications citées précédemment dans lesquelles la taille des portées et le rang de parité étaient considérés comme des facteurs de risque et trois autres pour tester : l'âge de la femelle au moment de la mise-bas, l'occurrence de l'ENA chez la mère de la femelle et l'occurrence de l'ENA selon le mâle d'accouplement.

Dans un second temps, une caractérisation histologique de l'ENA à partir de coupes histologiques transversales d'intestins de souris issues du groupe contrôle et de souris du groupe ayant présenté une ENA ont permis de proposer un consensus quant à l'appellation de cette lésion. Un 2^e objectif consistait à confirmer l'absence de bactéries selon leur localisation préférentielle et leurs potentielles lésions caractéristiques associées.

Enfin, une caractérisation étiologique basée sur le travail préliminaire réalisé à l'Institut Pasteur avait pour but de déterminer si l'AVM et le NVM séquencés étaient également présents en quantité similaire aux gènes de ménage sur un nombre d'individus plus important. Cette partie avait également pour objectif d'apporter des éléments en faveur de l'exclusion d'une infection à *C. perfringens* et *C. piliforme*.

2. Matériels et méthodes

A. Etude épidémiologique : réalisation d'une base de données

L'objectif de cette étude était de tester certaines hypothèses épidémiologiques mises en avant à partir des facteurs de risque proposés dans les différentes publications mentionnées dans la bibliographie.

Afin de déterminer le rôle protecteur ou favorisant la survenue de l'ENA, plusieurs facteurs ont été analysés tels que : l'âge des femelles au moment de la mise bas, le rang de parité des femelles au moment de la mise bas, la taille de leur portée, l'occurrence de l'ENA chez la mère de la femelle allaitante, l'occurrence de L'ENA chez une femelle adoptive ou encore l'occurrence de l'ENA selon le mâle utilisé pour l'accouplement.

Pour cela, une approche observationnelle était privilégiée et une base de données a été réalisée à partir d'informations récoltées dans notre colonie de souris.

a. Construction de la base de données

Pour construire cette base de données, le tableur du logiciel Excel a été utilisé pour répertorier l'ensemble des femelles ayant mis bas au sein de l'animalerie étudiée entre janvier 2016 et décembre 2019.

Afin de répondre à certaines hypothèses évoquées dans la littérature, de nombreux éléments ont été intégrés dans le tableur. Dans la mesure du possible et pour chacune des femelles allaitantes, les informations suivantes ont été utilisées : lignée, identification, date de naissance, nombre de souriceaux, date de naissance des souriceaux, rang de gestation, mort d'ENA, euthanasie, mort intégrale de la portée, mâle d'accouplement, lignée du mâle, identification de la mère de la femelle, mère de la femelle morte d'ENA, identification du père de la femelle, ENA après adoption, si oui identification de la femelle de provenance des petits, si oui date d'adoption, cannibalisme.

Ces informations ont été obtenues à partir des fichiers de génotypage puis vérifiées avec les feuilles de suivi quotidien, le cahier d'élevage et les feuilles d'autopsie (Annexes 1, 2, 3, 4).

b. Analyse statistique

La base de données nous a permis d'obtenir des données brutes issues de notre colonie afin d'étudier la distribution des souris atteintes d'ENA et les souris non atteintes selon plusieurs facteurs. L'échantillonnage des groupes d'individus morts d'ENA et des individus contrôle était réalisé à partir des fonctions « trier » et « filtre » du logiciel Excel.

L'analyse statistique se déroulait en deux temps. Une première étape consistait à déterminer la présence d'une association statistique entre une variable et la survenue d'ENA. La valeur du degré de signification était calculée grâce au site BiostaTGV. La seconde étape consistait à étudier l'association causale à partir de calculs d'odd ratio lors d'association statistique significative. L'antériorité de l'exposition par rapport à l'apparition de l'ENA était systématiquement assurée pour les variables étudiées.

- *Distribution en fonction de l'âge de la femelle au moment de la mise-bas*

Pour décrire la distribution de la variable « âge au moment de la mise-bas » au sein des populations de souris atteintes d'ENA et de souris saines, des tranches d'âge d'un mois étaient constituées de

trois à 12 mois. La variable « mort d'ENA » est une variable binaire et l'âge est une variable quantitative, un test de Student a donc été utilisé.

Les conditions de réalisation du test de Student étaient respectées : les souris des groupes comparés étaient indépendantes, la distribution de l'âge des souris au moment de la mise-bas suivait une loi normale et la variance des deux groupes était considérée comme similaire avec une valeur du rapport des variances comprise entre 1/3 et 3, $Sa^2/Sb^2 = 0,83$.

L'hypothèse nulle pour cette exposition était : « Dans la population de souris entre la 2^e et 3^e semaine de lactation de l'animalerie étudiée, l'âge moyen des souris atteintes d'ENA est égal à l'âge moyen des souris non atteintes d'ENA ».

- *Distribution en fonction du rang de parité*

Pour décrire la distribution de la variable « rang de parité » au sein des populations de souris atteintes d'ENA et de souris saines, trois classes étaient réalisées. La variable « mort d'ENA » est une variable binaire et le rang de parité est une variable qualitative, un test du Chi² était requis. Néanmoins, une des conditions de réalisation du test n'était pas respectée : la taille attendue de certains échantillons était inférieure à cinq. Un test de Fisher était donc utilisé dans ce cas.

L'hypothèse nulle pour cette exposition était : « Dans la population de souris entre la 2^e et 3^e semaine de lactation de l'animalerie étudiée, le pourcentage de souris atteintes d'ENA est égal au pourcentage de souris non atteintes d'ENA quel que soit leur rang de parité ».

- *Distribution en fonction de la taille de la portée*

Pour décrire la distribution de la variable « taille de la portée » au sein des populations de souris atteintes d'ENA et de souris saines, les souris étaient classées selon le nombre de souriceaux par portée. La variable « mort d'ENA » est une variable binaire et la taille est une variable quantitative, un test de Student était requis. Les conditions de réalisation du test étaient respectées : les souris des groupes comparés étaient indépendantes, la distribution du nombre de souriceaux par portée suivait une loi normale et la variance des deux groupes était considérée comme similaire avec une valeur du rapport des variances comprise entre 1/3 et 3, $Sa^2/Sb^2 = 1,14$.

L'hypothèse nulle pour cette exposition était : « Dans la population de souris en 2^e et 3^e semaine de lactation de l'animalerie étudiée, le nombre de souriceaux moyen par portée chez les souris atteintes d'ENA est égal au nombre moyen de souriceaux par portée chez les souris non atteintes d'ENA ».

- *Distribution en fonction de l'occurrence de l'ENA chez la mère de la femelle allaitante*

Afin de décrire la distribution de la variable « occurrence de l'ENA chez la mère de la souris allaitante » au sein des populations de souris atteintes d'ENA et de souris saines, les souris étaient réparties dans un tableau de contingence. La variable « mort d'ENA » et l'occurrence de l'ENA chez la mère de la femelle allaitante sont binaires, un test du Chi² était donc requis. Néanmoins, une des conditions de réalisation du test n'était pas respectée : la taille attendue de certains échantillons était inférieure à cinq. Un test de Fisher était donc utilisé dans ce cas.

L'hypothèse nulle pour cette exposition était : « Dans la population de souris en 2^e et 3^e semaine de lactation de l'animalerie étudiée, l'occurrence moyenne de l'ENA chez la mère des souris allaitantes mortes d'ENA est égale à l'occurrence moyenne de l'ENA chez la mère des souris allaitantes non atteintes d'ENA ».

D'autre part, les conditions de calcul d'un odd ratio étaient réunies. Néanmoins, l'effectif « souris non atteintes d'ENA et issues d'une mère morte d'ENA » était nul et ne permettait pas de réaliser le calcul. Ainsi, une correction d'Haldane-Anscombe a été réalisée : la valeur de « 0,5 » a été rajoutée à chaque effectif.

- *Distribution en fonction de l'occurrence de l'ENA selon le mâle d'accouplement*

Afin de décrire la distribution de la variable « occurrence de l'ENA selon le mâle d'accouplement » au sein des populations de souris atteintes d'ENA et de souris saines, les accouplements de chaque des mâles et l'éventuelle survenue d'une ENA chez la femelle étaient répertoriés. Les variables « mort d'ENA » et l'occurrence de l'ENA selon le mâle d'accouplement sont binaires. De plus, un mâle d'accouplement peut intervenir dans plusieurs accouplements et avec différentes femelles, les séries sont donc appariées. Ainsi, un test de McNemar pour séries appariées était requis.

L'hypothèse nulle pour cette exposition était : « Dans la population de souris en 2^e et 3^e semaine de lactation de l'animalerie étudiée, la survenue moyenne d'une ENA chez des souris allaitantes mises à l'accouplement avec un mâle ayant été associé à une ENA lors de l'accouplement précédent est égale à de la survenue moyenne de l'ENA chez des souris allaitantes mises à l'accouplement avec un mâle n'ayant pas été associé à une ENA lors de l'accouplement précédent ».

B. Animaux

a. Conditions de vie des souris

Les souris étaient hébergées dans des cages en plastique (polycarbonate), avec des grilles en acier inoxydable, contenant un enrichissement environnemental (maison et coton), dans des salles maintenues à 22 ± 2 °C avec un taux de renouvellement d'air de 12 volumes par heure et éclairées de sept heures à 19 heures. La nourriture et l'eau étaient données à volonté. La nourriture était soit une alimentation d'entretien (3188 kcal/kg provenant des glucides (64%), des protéines (24%) et des lipides (12%) ; alimentation d'entretien pour souris #C1324, Altronim) soit une alimentation d'élevage (C1314, Altronim).

Lorsqu'une femelle en accouplement était vue gestante, elle était isolée dans une cage neuve avec du matériel de nidification en plus de l'enrichissement habituel et avec de l'aliment d'élevage jusqu'au sevrage de ses petits à un mois après la naissance. Les souris étaient euthanasiées par dislocation cervicale lorsqu'elles étaient retrouvées moribondes.

b. Caractéristiques des individus utilisés dans cette étude

Face à la rapidité de décomposition de l'intestin déjà altéré chez les individus morts d'ENA, l'obtention d'échantillon était difficile. Ainsi, tout individu mort d'ENA ou retrouvé moribond était prélevé lorsque l'état de putréfaction était le moins avancé possible. Les prélèvements provenaient majoritairement de femelles allaitantes, de quelques souriceaux et mâles exceptionnellement affectés (Annexes 5 et 6). En ce qui concerne les RT-qPCR, 12 échantillons ont été utilisés : six échantillons d'individus atteints d'ENA, nommés de R1 à R6 et six échantillons d'individus contrôle nommés de S1 à S6.

C. Autopsie et prélèvements

Au cours de cette étude, l'une des principales difficultés était de gérer les processus d'altération et de putréfaction compte tenu du fait que les lésions intéressaient principalement les viscères

digestifs, d'autant plus sensibles à l'action lytique de la flore bactérienne. D'autre part, nos études histologiques et étiologiques portant sur des lésions décrites comme similaires à ces processus de décomposition et ce du vivant de l'individu, il était indispensable de réaliser ces autopsies dans les meilleurs délais. Ainsi, afin de limiter l'apparition d'artefacts lésionnels une standardisation du processus a été mise en place. Les individus retrouvés morts étaient placés au réfrigérateur à 4°C et inclus dans l'étude selon l'état de conservation du corps. Chaque autopsie était pratiquée le plus rapidement possible après euthanasie des souris moribondes. Pour garantir une reproductibilité de récolte des données, les autopsies étaient systématiquement réalisées par le Pr Fanny Pilot-Storck, Docteur en médecine vétérinaire et Maître de conférences à l'EnvA spécialisée dans les animaux de laboratoire.

Nos études nous ont conduits à prélever de façon systématique des échantillons d'intestin grêle lysés et sains destinés aux recherches histologiques, virologiques et bactériologiques. Le gros intestin, le caecum, le foie et le cœur étaient prélevés afin d'étudier certaines hypothèses d'infections à Clostridies. Les prélèvements à destination de l'étude étiologique étaient entreposés dans des tubes *Eppendorf* dans un congélateur à -80°C. A l'inverse, les échantillons destinés à l'étude histologique étaient fixés avec une solution tamponnée de formol. Enfin, des échantillons de cœur, de foie, de caecum, de gros intestin et de thymus ont été récoltés pour d'éventuels projets de recherche.

D. Etude histologique

a. Préparations des prélèvements

Comme évoqué précédemment, la localisation et le type de lésions impliquaient de limiter au maximum les artefacts liés à la putréfaction. Certains segments d'intestins destinés à l'étude histologique étaient donc préalablement perfusés avec une solution formolée avant leur mise en pot afin de préserver au mieux la structure histologique au moment du décès.

b. Méthode de réalisation des lames

Une fois fixés, les prélèvements de chaque organe étaient recoupés en tranches de quelques millimètres d'épaisseur puis déposés dans des cassettes pour chaque animal. Les tissus étaient ensuite inclus en paraffine et la réalisation des coupes histologiques était effectuée avec un microtome. Enfin, une coloration histologique standard à l'hémalum-éosine-safran (HES) était réalisée. La préparation des lames était principalement réalisée par Madame Hélène Huet, ingénieure d'étude du secteur d'anatomie pathologique du BioPôle de l'EnvA.

c. Photographies

Les lames étaient observées avec un microscope Zeiss Imager Z1 et photographiées grâce au logiciel de traitement ZEN 2 par Monsieur Jean-Luc Servely, responsable du plateau technique de microscopie et d'imagerie du secteur d'anatomie pathologique du BioPôle.

d. Description histologique

Les observations et les descriptions histologiques étaient soumises à la validation du Dr Edouard Reyes-Gomez. Les termes pour décrire cette lésion étaient choisis en concertation par le Pr Fanny Pilot-Storck et le Dr Edouard Reyes-Gomez.

E. Recherche d'agent infectieux

Cette étude étiologique était en partie conçue sur la base des données bibliographiques corroborées par les observations cliniques au sein de notre colonie par le Pr Henri-jean Boulouis et le Dr Anne-Claire Lagrée, tous deux spécialistes en bactériologie au laboratoire de microbiologie du BioPôle de l'EnvA. L'hypothèse d'une infection à clostridies ne pouvant être exclue, une exploration dans le but d'exclure ces agents bactériens était requise.

A l'inverse, l'étude préliminaire menée à l'Institut Pasteur apportait de solides preuves en faveur d'une infection virale. Dès lors, l'implication d'un AVM et d'un NVM semblait être une piste à privilégier.

Ainsi, l'hypothèse d'une co-infection par ces deux types de virus dans un contexte de stress métabolique issu d'une demande énergétique élevée était envisagée. Afin de confirmer les résultats préliminaires, une recherche virologique sur un plus grand nombre d'échantillons a été réalisée.

a. Etude de causes bactériennes

Du fait de la similarité des contextes clinique et épidémiologique, l'hypothèse d'un portage de clostridies au sein de l'animalerie a été explorée.

- *Hypothèse d'infection à Clostridium perfringens*

- Mise en culture anaérobie

C. perfringens étant un agent bactérien anaérobie de la flore commensale, son observation n'est pas suffisante et doit être complétée par la mise en évidence des gènes de toxines bactériennes par PCR. Cette recherche nécessite une remise en culture des échantillons qui a été tentée par l'équipe du laboratoire de bactériologie sur l'ensemble des femelles mortes d'ENA, à partir de prélèvements intestinaux congelés.

- *Hypothèse d'infection à C. piliforme - Maladie de Tyzzer*

Compte tenu de l'absence de milieu synthétique permettant la culture de *C. piliforme* et de son caractère intracellulaire strict une méthode de PCR nichée a été envisagée.

b. Etude de causes virales par RT-qPCR

Cette étude a été entièrement conçue sur la base des travaux de recherche effectués par Noémie Bach au sein de l'équipe de l'Institut Pasteur. Contrairement à l'étude de base, une méthode de quantification relative a été utilisée à la place d'une quantification absolue. L'objectif était d'extrapoler la quantité initiale de virus, à partir des données issues de la gamme de dilution, puis de la comparer à la quantité initiale des gènes de ménage pour en déduire le degré d'importance de la charge virale.

Cette étude comportait une extraction de l'ARN viral de chaque échantillon, suivie d'une RT puis de la réaction de qPCR.

- *Extraction des ARN*

Les ARN ont été extraits à partir de la totalité des échantillons de jéjunum moyen grâce au kit RNeasy Qiagen selon le protocole indiqué. La concentration en ARN et la contamination éventuelle des échantillons étaient ensuite mesurées par spectrophotométrie Nanodrop.

- *Purification des ARN totaux*

Un rapport d'absorbance 260/230 inférieur à 1,6 indique une contamination par des éléments issus de l'échantillon ou des molécules utilisées lors du processus de purification. Lors de contamination, les ARN étaient précipités afin de les purifier. Pour cela, 40 µL de solution d'ARN contaminés étaient mélangés avec 4,5 µL d'acétate de sodium 3 M et 125 µL d'éthanol 96° puis congelés à -20°C pendant la nuit. L'ensemble était ensuite centrifugé et le surnageant retiré. Pour finir, 20 µL d'eau était utilisés pour resuspendre les ARN purifiés.

- *Etape de RT*

L'étape de RT était réalisée à l'aide du kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher®)*, optimisé pour la synthèse d'ADNc. Ce kit contenait un mélange réactionnel composé d'un tampon de réaction, d'oligonucléotides libres, d'amorces hexamères aléatoires et d'un mélange d'enzymes dont la rétrotranscriptase.

Le mélange réactionnel de RT comprenait un microgramme (µg) d'ARN dans un volume total de 20 microlitres (µL), soit une concentration de $5,0 \cdot 10^{-2}$ µg/µL, 4 µL de tampon de réaction 5X, 2 µL du mélange d'enzymes et était complété avec de l'eau purifiée en quantité suffisante pour 20 µL.

La réaction de RT était réalisée dans un thermocycleur *Eppendorf* selon trois phases : une phase d'hybridation des amorces pendant 10 minutes à 23 °C, une phase de polymérisation de l'ADN pendant 10 minutes à 50°C et une phase d'arrêt de la réaction pendant 10 minutes à 80°C.

- *Préparation de l'étape de qPCR*

L'étape de qPCR était réalisée à l'aide d'un thermocycleur *Lightcycler® 96* selon un protocole identique pour chaque expérience. La réaction de qPCR se produisait dans une plaque de 96 puits organisée en fonction du nombre de gènes et d'échantillons à tester. Une plaque de dilution des ADNc permettait de préparer les gammes de dilution et les puits contenant les ADNc des différents échantillons.

- Plaque de dilution et gamme de dilution

Pour chaque puits d'échantillon, les ADNc de tous les individus testés étaient dilués au 100^e.

Pour chaque gène testé, une gamme de dilution de six points était systématiquement constituée pour extrapoler le nombre de copies initialement présentes dans nos échantillons. La plaque de dilution comprenait six puits réalisés selon une dilution en cascade à partir du premier point le plus concentré. Le premier puits contenait de l'ADNc de l'échantillon calibrateur dilué au 25^e soit six µL d'ADNc mélangés à 144 µL d'eau. Le second point était constitué selon un facteur de dilution de deux, en prélevant 75 µL du premier puits ajouté au même volume d'eau, et ainsi de suite pour cinq puits. Le dernier puits ne comprenait que de l'eau.

- Mélange de qPCR

Les réactifs étaient préparés dans un tube *Eppendorf* pour chaque gène en fonction du nombre d'échantillons testés. Le volume total de chaque puits était de 15 µL et devait contenir 7,5 µL de mélange réactionnel d'enzymes, 0,75 µL d'amorces sens et anti-sens et 1 µL d'eau auxquels était ajouté 5 µL d'ADNc dilué, équivalents à 1 µg d'ARN de départ. Les amorces conçues par l'équipe de l'Institut Pasteur lors de l'étude préliminaire ont été utilisées ici à une concentration de 10 mM (Tableau 2).

- *Sélection d'échantillons calibrateurs*

La sélection de l'échantillon calibrateur a été réalisée par une étudiante en DUT et stagiaire dans le laboratoire, Romane Schmidt, sous la direction de Nahed Khadhraoui, doctorante dans le laboratoire.

La sélection de l'échantillon calibrateur devait être effectuée à partir d'individus morts d'ENA afin de choisir celui dont la valeur de Ct était la plus élevée, et si possible pour l'ensemble des couples d'amorces. Les six premiers individus morts d'ENA ont été utilisés (Annexe 6). Les couples d'amorces noro 1, astro 1 et astro 2 étaient testés à une température de fusion (T_m) de 54°C.

- *Ajustement de la température de fusion*

La T_m optimale des amorces choisies était issue des données fournies par l'Institut Pasteur. Afin d'optimiser le fonctionnement de la réaction de qPCR, les T_m de 54°C et 56°C ont été testées avec un protocole identique. D'autre part, tous les couples d'amorces ont été testés, uniquement sur une gamme de dilution réalisée à partir de l'échantillon calibrateur déterminé lors de l'expérience précédente : l'échantillon R1.

- *Essais de mise au point de la réaction de qPCR*

Face aux difficultés à obtenir des résultats répétables, plusieurs essais de mise au point de la réaction ont été réalisés. Le protocole de chaque réaction a été conservé. Les dilutions des échantillons, des gammes et des couples d'amorces ont été renouvelées à partir des tubes concentrés afin de garantir l'absence de contamination.

Chaque réaction de qPCR démarrait par une séquence de dénaturation initiale à 95°C pendant 300 secondes suivie de 45 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, d'hybridation à 54°C ou 56°C pendant 20 secondes et d'élongation à 72°C pendant 20 secondes. Deux températures d'hybridation ont été testées : une à 54°C puis une à 56°C afin d'augmenter la spécificité de la réaction. Enfin, une courbe de fusion était réalisée par augmentation de la température à 95°C pendant une minute, un retour à 40°C pendant une minute, une montée à 65°C pendant 15 secondes et puis une montée progressive jusqu'à 97°C pendant 1 seconde.

Trois réactions de qPCR ont été réalisées. Les deux premières réactions ont testé une gamme élaborée à partir de l'échantillon R1, et les échantillons des individus atteints d'ENA et contrôles pour les couples d'amorces astro 2 et 3. La seconde réaction a testé les mêmes paramètres pour les couples d'amorces noro 1 et 2.

- *Contrôle de la taille des amplicons sur gel d'électrophorèse*

Le contrôle de la taille des échantillons était réalisé sur gel d'électrophorèse. Les tailles attendues des amplicons sont disponibles sur la figure 5. Un gel 2% était réalisé en mélangeant de l'agarose à du Tris acétate EDTA et un agent intercalant de l'ADN, le *Red DNA Stain 10 000X*. Les amplicons étaient mélangés avec un colorant, le *Loading Dye 6X*. Les amplicons migraient ensuite grâce à un courant de 110 volts pendant une heure. Les gammes étaient notées de 1 pour le puits le plus concentré en ADNc à 1/16 pour le puits le plus dilué. Les échantillons d'individus atteints d'ENA étaient notés de R1 à R6 et les contrôles de S1 à S6.

- *Recherche d'un échantillon calibrateur par PCR*

Suite aux résultats des contrôles sur gel d'électrophorèse, un nouvel échantillon calibrateur, positif pour tous les couples d'amorces, a été recherché. Une méthode de PCR a été choisie afin de déterminer de façon qualitative quels échantillons étaient positifs pour l'AVM ou le NVM.

La réaction de PCR a été réalisée avec un automate *Eppendorf* à une T_m de 52°C afin d'amplifier le maximum de séquences présentes dans l'échantillon. La concentration en ADNc était de $2 \cdot 10^{-3}$ µg/µL par puits. Le kit utilisé était le *Felxi Gotaq®* (Qiagen) et les couples d'amorces étaient concentrés à 0,2 mM, les dNTP à 200 µM, la Taq polymérase à $4 \cdot 10^{-2}$ U/µL, et le chlorure de magnésium à 1,5 mM.

Chaque réaction de PCR démarrait par une séquence de dénaturation initiale à 96 °C pendant 300 secondes suivie de 45 cycles de dénaturation à 96 °C pendant 10 secondes, d'hybridation à 52 ou 54 °C pendant 20 secondes et d'élongation à 72 °C pendant 20 secondes. Deux températures d'hybridation ont été testées : une à 54°C puis une à 52°C afin d'augmenter la spécificité de la réaction.

Afin de mettre en évidence un nouvel échantillon calibrateur pour les gènes d'astrovirus et de norovirus, quatre échantillons positifs pour au moins un des gènes ont été sélectionnés : R3, R4, S4 et S5. Chacun d'entre eux a ensuite été testés un par un pour tous les couples d'amorces.

3. Résultats

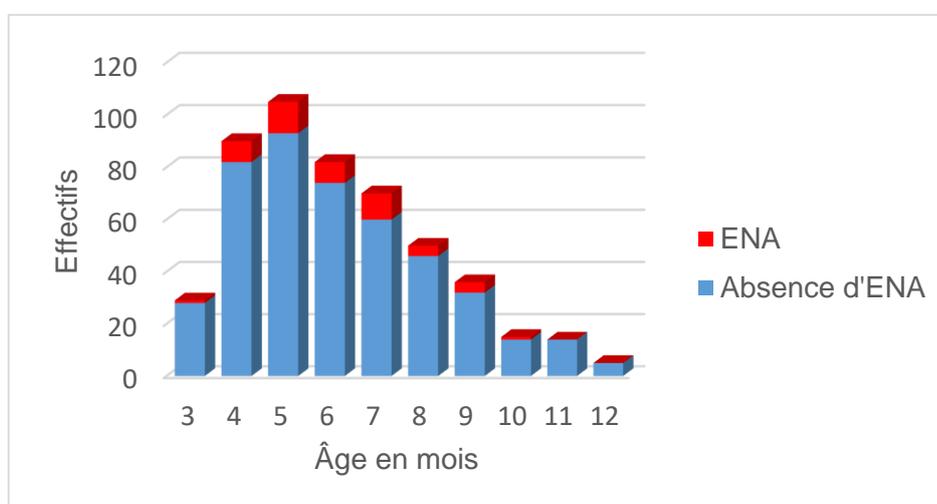
A. Etude épidémiologique à partir de la base de données

La base de données brute est consultable en annexe (Annexe 7).

a. Age des femelles

Dans notre colonie, les souris mettaient bas entre l'âge de 3 mois et un an. De plus, 80% des mise-bas se produisaient entre l'âge de quatre et huit mois (Figure 8). L'âge moyen de mise-bas chez les souris atteintes d'ENA était de 6,15 mois contre 6,13 mois pour les souris saines.

Figure 8 : Distribution des souris atteintes d'entérite nécrosante aiguë et des souris non atteintes en fonction de l'âge au moment de la mise-bas.



Après réalisation du test de Student, la valeur de degré de signification est de : $p = 0,94$, H_0 était donc acceptée au risque d'erreur β inconnu. Dans l'échantillon de souris de l'animalerie étudiée, l'âge moyen des souris atteintes d'ENA n'était significativement pas différent de l'âge moyen des souris non atteintes.

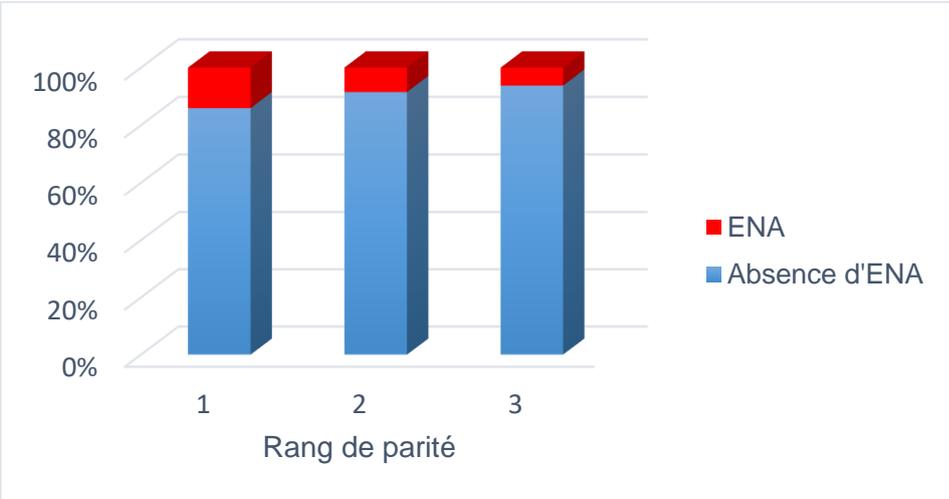
b. Rang de parité

Dans notre colonie, 14% des souris allaitantes au rang de parité 1 présentaient une ENA, soit 43 femelles sur 262 ; 8% des souris au rang de parité 2, soit neuf femelles sur 97 ; Et 6% des souris au rang de parité 3, soit une femelle sur 15 (Figure 9A et 9B).

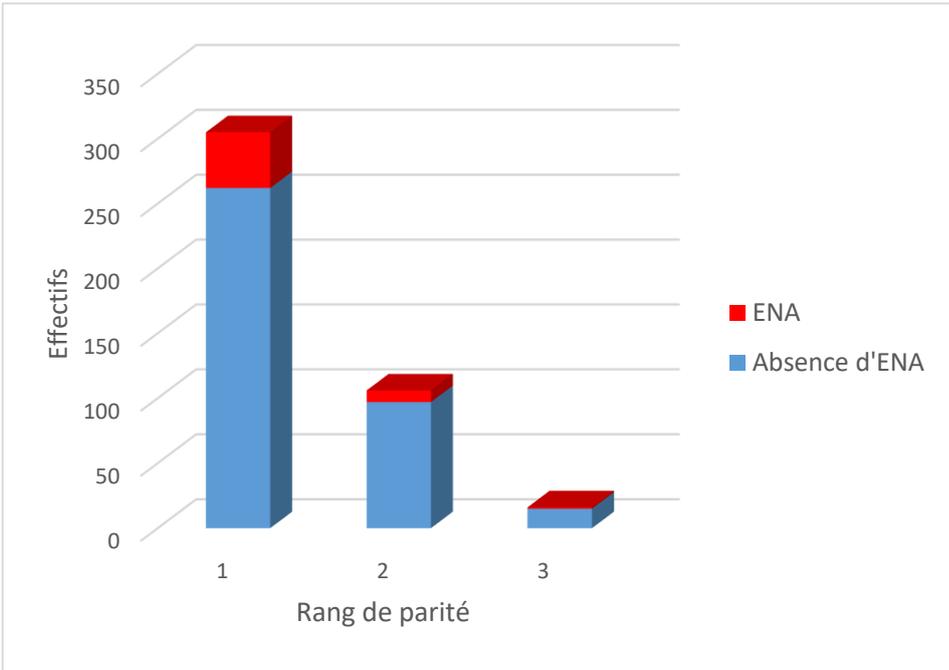
Après réalisation du test de Fisher, la valeur de degré de signification était de : $p = 0,31$, H_0 était donc acceptée au risque d'erreur β inconnu. Dans l'échantillon de souris de l'animalerie étudiée, le rang de parité moyen des souris atteintes d'ENA n'était significativement pas différent du rang de parité moyen des souris non atteintes.

Figure 9 : Distribution relative (A) et absolue (B) des femelles atteintes d'entérite nécrosante aiguë et des femelles non atteintes en fonction du rang de parité.

(A)



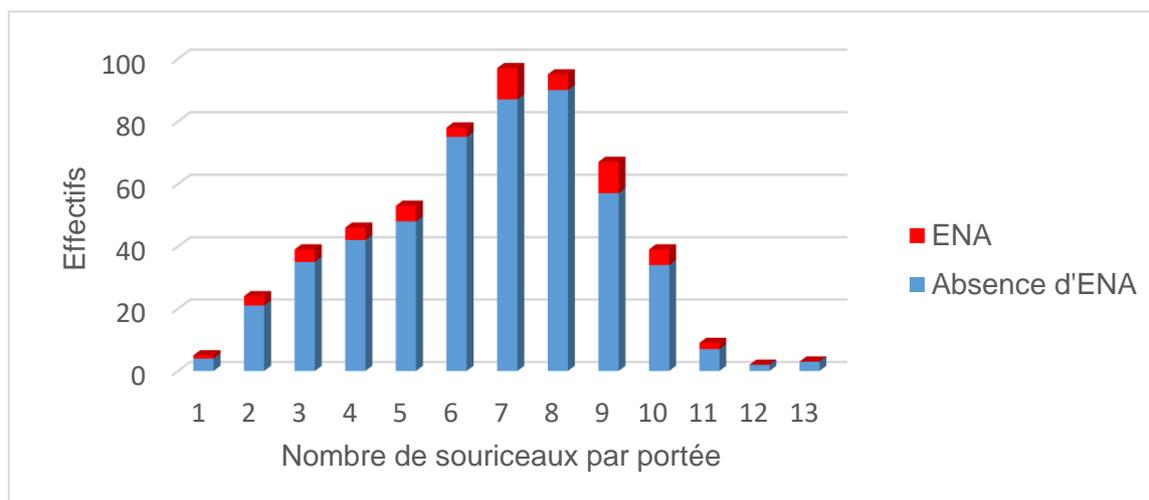
(B)



c. Taille des portées

La moyenne du nombre de souriceaux par portée chez les souris atteintes d'ENA était de 6,7 contre 6,6 pour les souris non atteintes d'ENA (Figure 10).

Figure 10 : Distribution des souris atteintes d'entérite nécrosante aiguë et des souris non atteintes en fonction de la taille de la portée.



Après réalisation du test de Student, la valeur de degré de signification est de : $p = 0,69$, H_0 était donc acceptée au risque d'erreur β inconnu. Dans l'échantillon de souris de l'animalerie étudiée, le nombre moyen de souriceaux par portée des souris atteintes d'ENA n'était significativement pas différent du nombre moyen de souriceaux par portée des souris non atteintes.

d. Occurrence d'entérite nécrosante chez les mères des femelles allaitantes

Dans notre colonie, la survenue d'une ENA chez la mère d'une souris allaitante a engendré systématiquement une ENA chez la souris allaitante. Un tableau de contingence montre la répartition des souris en fonction de l'exposition « occurrence de l'ENA chez la mère de la souris allaitante » (Tableau 4).

Tableau 4 : Répartition des souris selon l'exposition « occurrence de l'entérite nécrosante aiguë chez la mère de la souris ».

	Femelle ENA+	Femelle ENA-	Total
Mère de la souris allaitante ENA+	6	0	6
Mère de la souris allaitante ENA-	38	298	336
Total	44	298	342

Après réalisation du test de Fisher, la valeur de degré de signification était de : $p = 1,89E-7$, H_0 était donc rejetée au risque d'erreur α de 5%. Dans l'échantillon de souris de l'animalerie étudiée, l'occurrence moyenne de l'ENA chez la mère des souris allaitantes mortes d'ENA était

significativement différente de l'occurrence moyenne de l'ENA chez la mère des souris allaitantes non atteintes d'ENA.

Après correction d'Haldane-Anscombe, l'estimation de l'odd ratio était de 171 [9,46 ; 3093,1] (Valenzuela, 1993). Dans l'échantillon de souris de l'animalerie étudiée, la survenue d'ENA était beaucoup plus fréquente parmi les souris allaitantes issues d'une mère morte d'ENA que parmi les souris allaitantes issues d'une mère non atteinte d'ENA.

e. Occurrence d'entérite nécrosante aiguë selon le mâle d'accouplement

Dans l'animalerie étudiée, 47 mâles ont été associés à un total de 54 ENA chez les souris allaitantes avec qui ils avaient été accouplés pour un total de 125 accouplements. Parmi ces mâles, 30 ont été à l'origine de portées multiples et neuf d'un accouplement unique.

Nous nous sommes posé la question de savoir si le mâle pouvait être à l'origine de la transmission de l'ENA aux femelles avec lesquelles il a été accouplé. Dans cette hypothèse, on s'attendait à ce que les accouplements suivant un accouplement ayant été associé à une ENA soient associés à un excès d'ENA. Nous nous sommes donc intéressés aux 78 accouplements des mâles ayant eu plusieurs portées pour étudier l'occurrence d'une ENA chez un mâle ayant précédemment été associé à une ENA.

Dans l'animalerie étudiée, la proportion d'ENA parmi les souris allaitantes mises à l'accouplement avec un mâle ayant été associé à une ENA à l'accouplement précédent était de 19%, soit six souris allaitantes sur 32. D'autre part, la proportion d'ENA parmi les souris allaitantes mises à l'accouplement avec un mâle n'ayant pas été associé à une ENA à l'accouplement précédent était de 43%, soit 20 souris allaitantes sur 46.

Le tableau 5 montre la répartition de survenue des ENA en fonction de l'accouplement précédent.

Tableau 5 : Tableau de contingence pour la variable « occurrence de l'entérite nécrosante aiguë selon le mâle d'accouplement ».

	ENA	Absence d'ENA	Total
Après un accouplement ayant été associé à une ENA	6	26	32
Après un accouplement n'ayant pas été associé à une ENA	20	26	46
Total	26	52	78

Après réalisation du test de McNemar pour séries appariées, la valeur de degré de signification était de : $p = 0,02$, H_0 était donc rejetée au risque d'erreur α de 5%. Dans l'échantillon de souris de l'animalerie étudiée, la survenue moyenne d'une ENA chez des souris allaitantes mises à l'accouplement avec un mâle ayant été associé à une ENA lors de l'accouplement précédent était significativement différente de la survenue moyenne de l'ENA chez des souris allaitantes mises à l'accouplement avec un mâle n'ayant pas été associé à une ENA lors de l'accouplement précédent.

L'estimation de l'odd ratio était de 0,3 [0,1 ; 0,87]. Dans l'échantillon de souris de l'animalerie étudiée, la survenue d'une ENA était moins fréquente parmi les souris allaitantes accouplées avec un mâle dont l'accouplement précédent avait été associé à une ENA chez la femelle que parmi les souris allaitantes accouplées avec un mâle dont l'accouplement précédent n'avait pas été associé à une ENA chez la femelle.

B. Caractérisation histologique des lésions

L'objectif de cette étude histologique était de caractériser les lésions microscopiques associées à l'ENA et d'identifier de potentiels agents pathogènes bactériens.

a. Description de coupes du système digestif d'une souris saine

A l'autopsie, l'ensemble du tractus digestif des souris du groupe contrôle était normal. Seule une souris présentait des oxyures dans le caecum. En microscopie optique, l'intestin grêle des souris ne présentait pas d'artéfacts liés à la putréfaction, permettant une interprétation optimale des images.

- *Description du duodénum et du jéjunum*

A faible grossissement, l'intestin grêle était normal (Figure 11A). La lumière intestinale contenait quelques fibres alimentaires. La conformation circulaire et la disposition en couche de l'intestin étaient conservées. Les cinq couches de la paroi étaient aisément distinguables et d'aspect normal se composant du centre vers la périphérie de la muqueuse, comportant de longues villosités régulières aux contours lisses et des glandes ou cryptes s'enfonçant dans le chorion, parallèles les unes aux autres, la musculaire-muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse.

A faible grossissement, la muqueuse comportait de longues villosités, régulières aux contours lisses. La sous-muqueuse était également accolée de part et d'autre à la muqueuse et la musculeuse. La musculeuse était constituée de deux couches accolées et délimitées en périphérie par la séreuse. La lumière intestinale contenait quelques fibres alimentaires (Figure 11A).

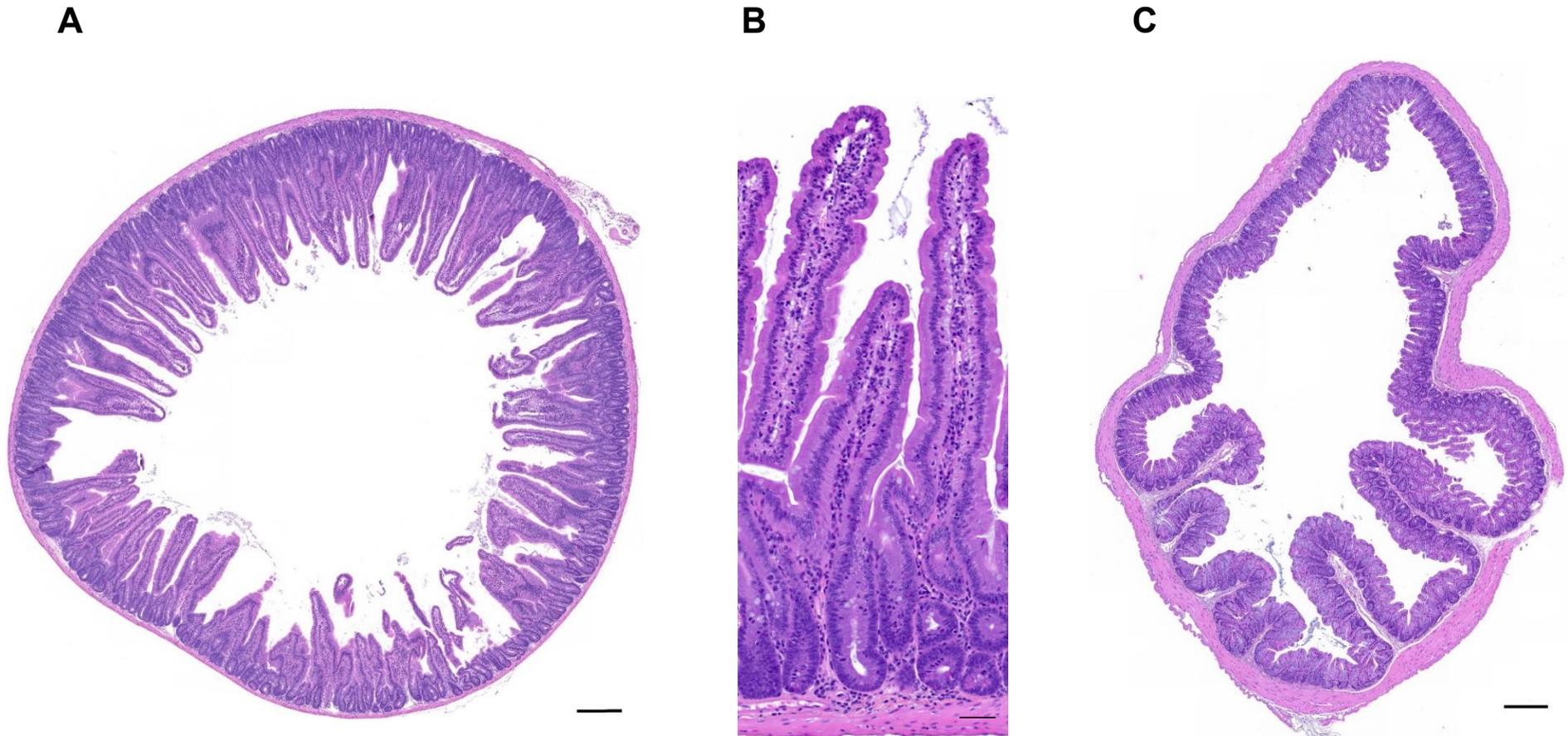
A fort grossissement, les contours de la muqueuse étaient bien lisses avec l'épithélium intègre (Figure 11B). Dans la muqueuse, les différents types cellulaires de l'épithélium étaient présents : entérocytes et cellules caliciformes à pôle muqueux ouvert composant principalement les villosités ainsi que les entéroblastes et les cellules de Paneth dans les cryptes. Dans la sous-muqueuse du duodénum, des glandes de Brünner intactes étaient visibles au sein du tissu conjonctif. La musculeuse était formée de deux couches de muscles lisses, circulaire et longitudinale. La séreuse était constituée d'un mince tissu conjonctif.

- *Description du gros intestin*

Le gros intestin était normal avec une architecture en couche régulière, de structure semblable au duodénum, hormis l'absence de villosités et de glandes Brünner ainsi que la plus forte densité en cellules caliciformes dans l'épithélium (Figure 11C).

Figure 11 : Coupe histologique transversale du duodénum (A et B) et du côlon (C) d'une souris contrôlée.

(A-B) Coupe de duodénum à faible (A) et moyen (B) grossissement. (C) Coupe de côlon à faible grossissement. Noter la conformation en couches de l'intestin grêle et du côlon. La muqueuse est composée de longues villosités de forme régulière. La sous-muqueuse du duodénum comporte des cryptes et des glandes de Brünner intactes. Coloration hémalun-éosine-safran. Mosaïque au grossissement X20, barre d'échelle de 250 μm (A et C), grossissement X20, barre d'échelle de 50 μm (B).



b. Description histologique de coupes d'intestin grêle d'une souris à un stade débutant

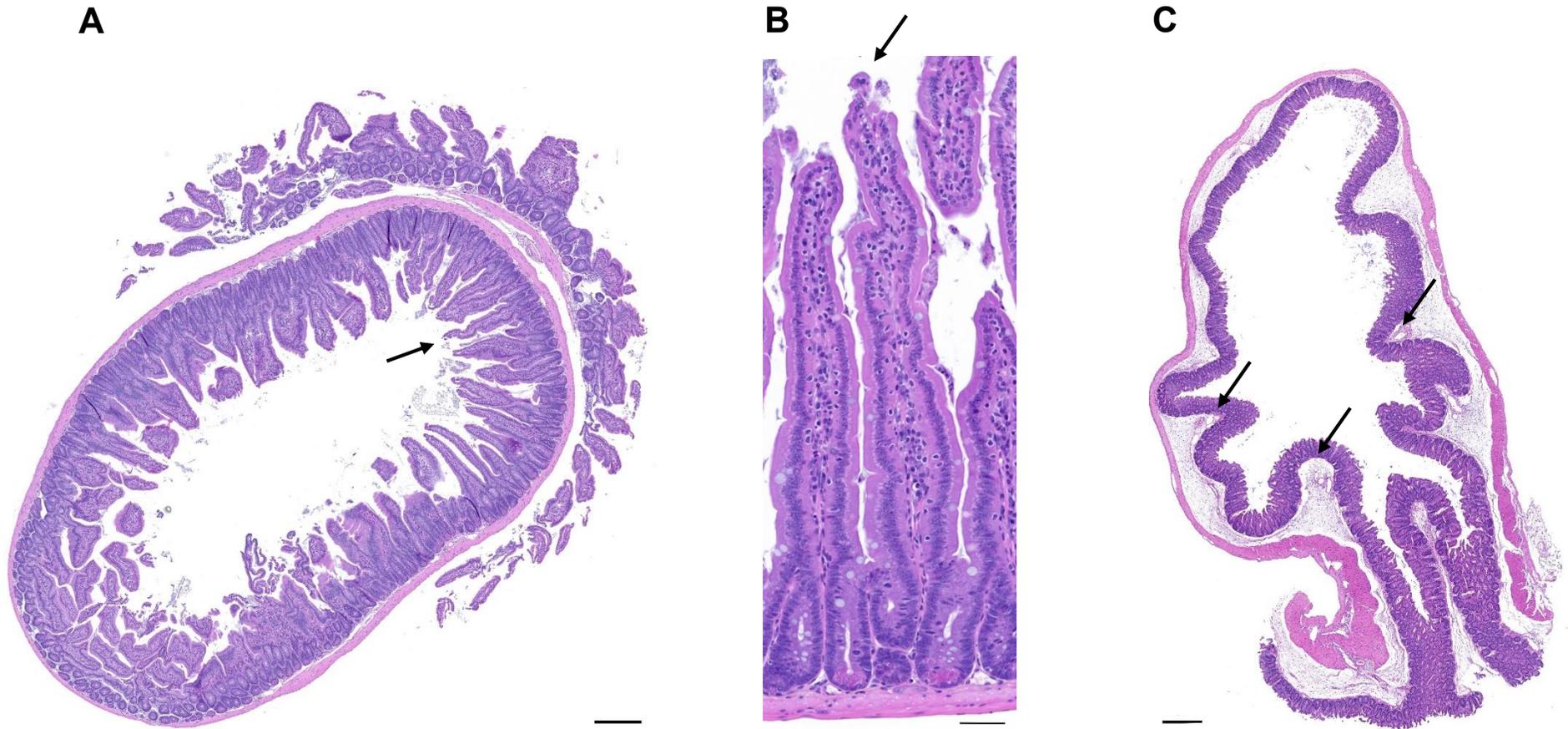
L'une des souris était prostrée et avait l'anus souillé au moment de son euthanasie mais ne présentait aucune lésion intestinale à l'autopsie. Bien que l'organisation des couches intestinales ait été encore présente, les coupes histologiques ont montré des anomalies. La muqueuse en particulier était concernée : les villosités étaient raccourcies suite à une exfoliation de l'épithélium intestinal (figure 12A).

A plus fort grossissement, des débris cellulaires constitués d'amas de cellules acidophiles et arrondies, composant initialement l'épithélium des villosités avant leur érosion, étaient visibles dans la lumière intestinale. L'exfoliation des villosités concernait principalement la partie distale (Figure 12B).

En ce qui concerne le gros intestin, la muqueuse présentait également une exfoliation des cellules de l'épithélium. De plus, un décollement marqué de la sous-muqueuse par rapport à la musculature était également observé. Néanmoins, en l'absence d'érosion complète de la muqueuse ce décollement correspondait probablement à un artéfact post-mortem, comme constaté précédemment sur les coupes du groupe contrôle (Figure 12C).

Figure 12 : Coupe histologique transversale du duodénum chez une souris à un stade débutant de l'entérite nécrosante aiguë.

(A-B) Coupe de duodénum à faible (A) et moyen (B) grossissement. (C) Coupe de côlon à faible grossissement. (A) L'organisation en couches est conservée mais la pointe des villosités s'érode (flèche) laissant quelques amas de cellules acidophiles et arrondies dans la lumière intestinale. (B) La base des villosités est intègre mais la partie distale des villosités montre une discrète exfoliation de quelques cellules. (C) La muqueuse présente une discrète exfoliation de l'épithélium et un décollement de la sous-muqueuse (flèches) et de la muqueuse est visible. Coloration hémalun-éosine-safran. Mosaïque au grossissement X20, barre d'échelle de 250 µm (A et C), grossissement X20, barre d'échelle de 50 µm (B).



c. Description de coupes d'intestin grêle d'une souris à un stade lésionnel intermédiaire

L'euthanasie de souris retrouvées moribondes a permis d'obtenir des prélèvements à différents stades d'évolution de l'ENA.

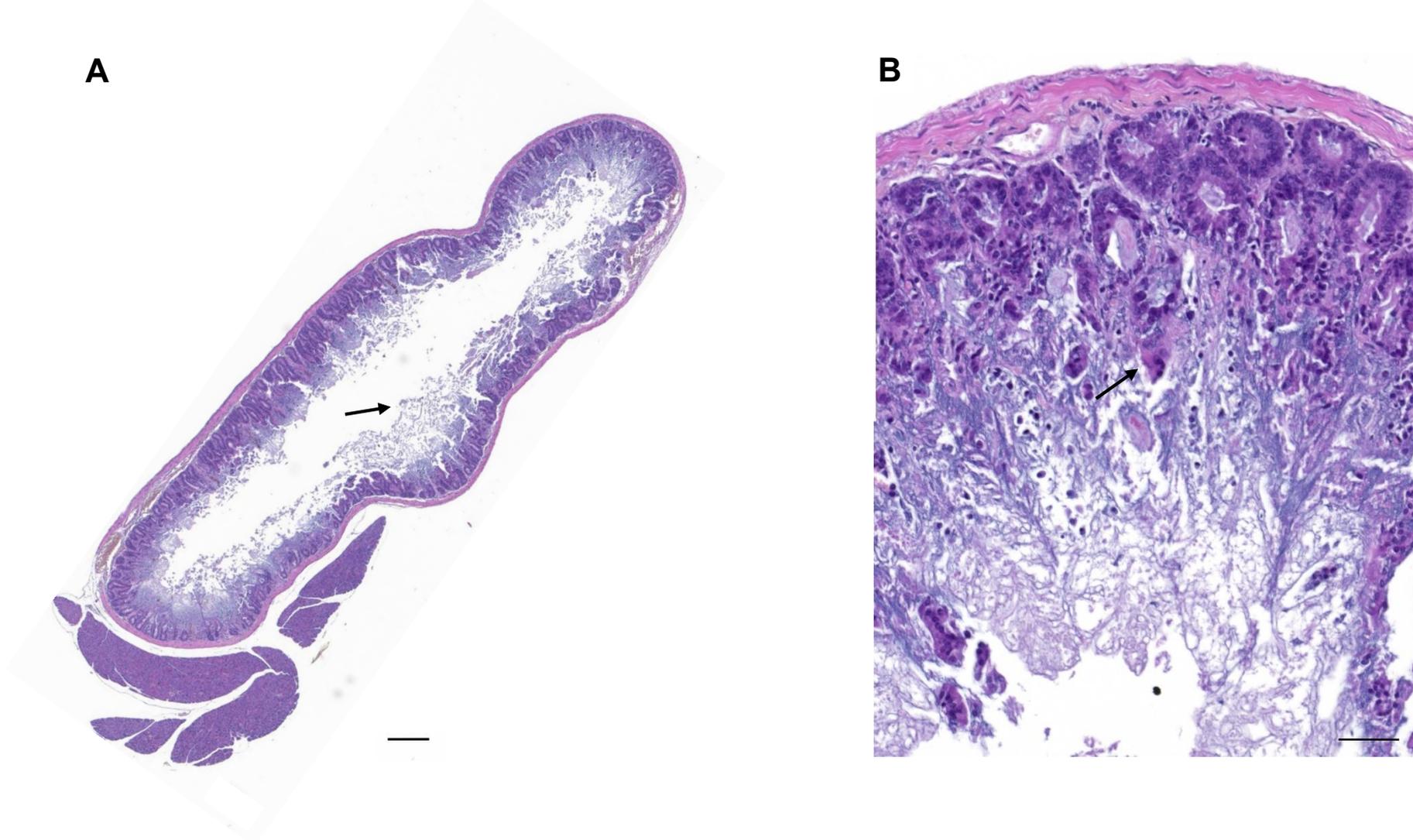
A un stade lésionnel intermédiaire, les couches les plus internes du duodénum étaient altérées : la muqueuse et la sous-muqueuse montraient une perte de la structure en couches avec une érosion presque complète des villosités, remplacées par des débris cellulaires acidophiles baignant dans un mucus basophile. La base des villosités était encore visible bien que certaines cellules aient été parfois acidophiles et arrondies, traduisant leur nécrose. De discrets artéfacts de décollement de la sous-muqueuse étaient également présents (Figure 13A).

Deux schémas lésionnels se distinguaient parmi les souris mortes d'ENA selon une évolution proximo-distale : un stade plus avancé en partie proximale du duodénum et un stade en cours d'évolution en partie distale du duodénum ou au niveau du jéjunum.

Le schéma lésionnel le plus avancé concernait systématiquement le duodénum proximal. Certaines portions avaient une couleur basophile et étaient constituées de débris cellulaires et de mucus provenant des cellules nécrosées (Figure 13B). La perte d'organisation cellulaire de ces zones ne permettait pas de reconnaître l'intestin.

Figure 13 : Coupe transversale du duodénum chez une souris morte d'entérite nécrosante aiguë à un stade intermédiaire.

(A-B) Coupe de duodénum à faible (A) et moyen (B) grossissement. L'architecture en couches du duodénum est conservée. Les villosités ne sont presque plus visibles et sont remplacées par des débris cellulaires acidophiles emprisonnés dans une quantité importante de mucus basophile (flèche). Coloration hémalum-éosine-safran. Mosaïque au grossissement X20, barre d'échelle de 250 μ m (A) et grossissement X20, barre d'échelle de 50 μ m (B).

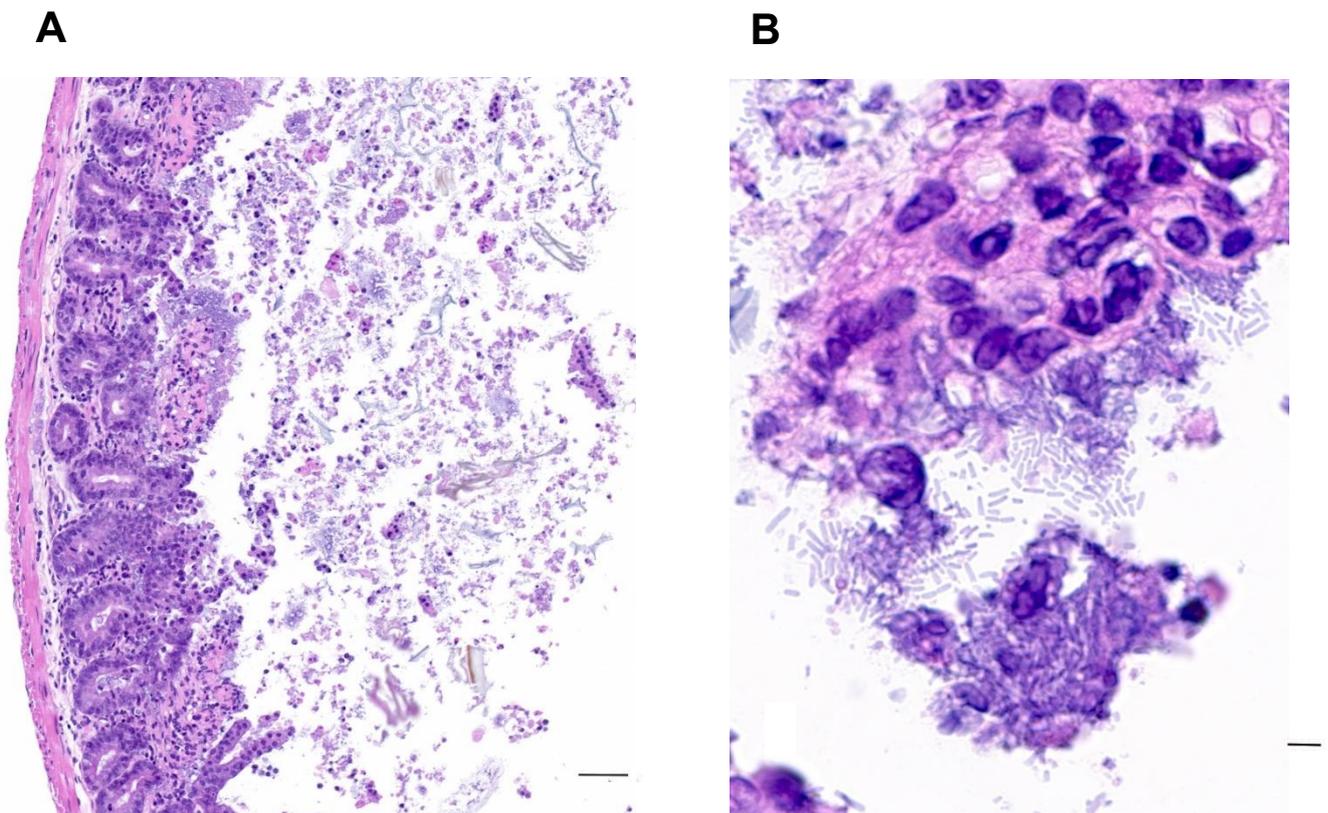


Le schéma lésionnel en cours d'évolution concernait la partie distale du duodénum au jéjunum selon l'avancée de la maladie. Certaines zones comportaient des villosités dénudées et raccourcies moins sévèrement que dans le duodénum proximal. Elles montraient des signes de nécrose avec de nombreuses cellules au cytoplasme acidophile et aux contours cellulaires flous. La lumière intestinale à proximité comportait une quantité abondante de cellules isolées et de débris cellulaires (Figure 14A).

A fort grossissement, les cellules apparaissaient arrondies et acidophiles. Certaines cellules étaient en amas ou détachées les unes des autres et flottaient dans la lumière intestinale. On distinguait également un nombre important de bacilles présents dans la lumière intestinale, l'épithélium et le chorion (Figure 14B). Les deux schémas lésionnels pouvaient se superposer selon l'intensité des lésions.

Figure 14 : Coupe transversale du jéjunum chez une souris morte d'entérite nécrosante aiguë à un stade intermédiaire.

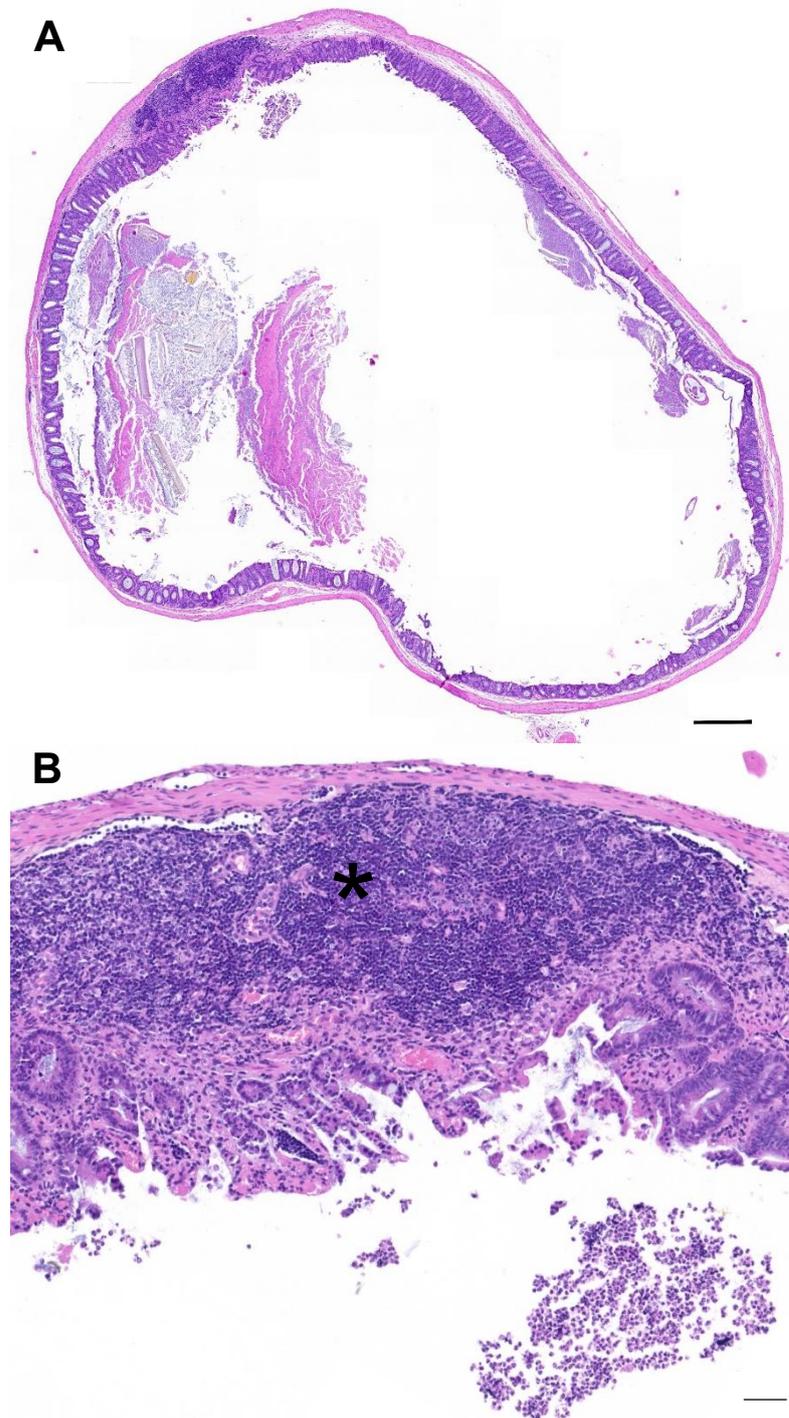
(A-B) Coupe de jéjunum à moyen (A) et fort (B) grossissement. (A) La muqueuse et la sous-muqueuse ne sont plus discernables. Les débris cellulaires acidophiles baignant dans un mucus basophile sont bien visibles. (B) Présence en quantité importante de bacilles ayant colonisé la muqueuse et la sous-muqueuse. Coloration hémalum-éosine-safran. Grossissement x20, barre d'échelle de 50 µm (A) et grossissement x100, barre d'échelle de 10 µm (B).



L'organisation structurale du gros intestin était conservée. Néanmoins, la muqueuse était érodée par une discrète exfoliation cellulaire (Figure 15A). D'autre part, des cellules en apoptose étaient visibles au sein des plaques de Peyer (Figure 15B).

Figure 15 : Coupe histologique transversale de gros intestin de souris morte d'entérite nécrosante aiguë à un stade intermédiaire.

(A-B) Coupe de gros intestin à faible (A) et moyen (B) grossissement. (A) L'organisation en couches est conservée et la surface de la séreuse est régulière. (B) Présence d'une érosion de la muqueuse avec exfoliation de l'épithélium des glandes intestinales. L'ensemble du tissu a un aspect acidophile. La plaque de Peyer montre des cellules en apoptose (*). Coloration hémalum-éosine-safran. Mosaïque au grossissement x20, barre d'échelle de 250 µm (A) et grossissement x20, barre d'échelle de 50 µm (B).



d. Description de coupes d'intestin grêle d'une souris à un stade lésionnel avancé

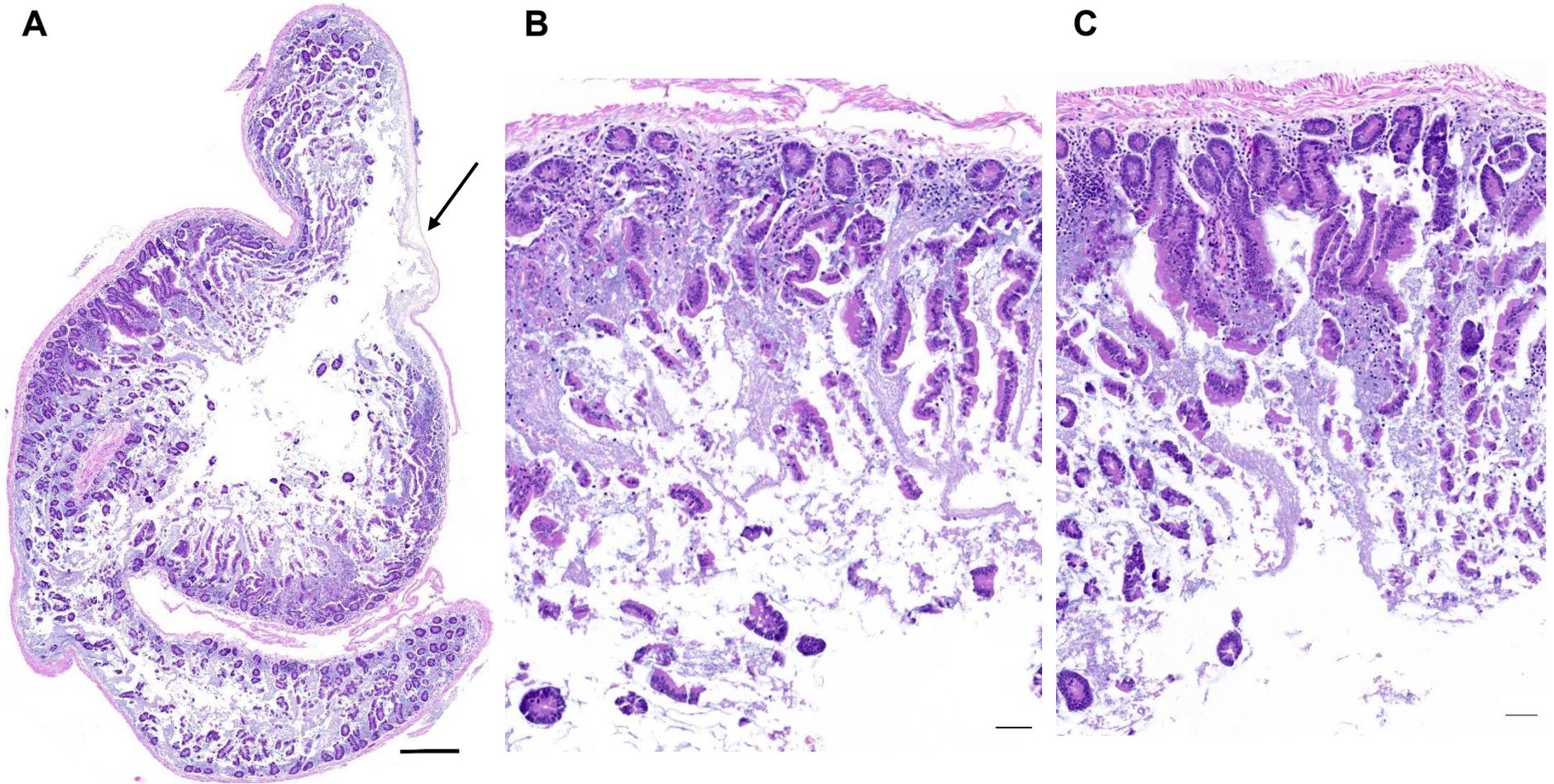
A un stade lésionnel avancé, il était difficile de reconnaître l'organe prélevé. L'organisation structurale était fortement altérée. L'intestin avait perdu sa conformation circulaire et sa structure en couches. Seule la musculature était discernable bien que présentant quelques altérations. Elle délimitait une zone dans laquelle les villosités n'existaient plus et étaient remplacées par des amas de débris cellulaires acidophiles à basophiles en quantité abondante baignant dans du mucus évoquant de putréfaction extrêmement rapide (Figure 16A).

Les cellules en cours de nécrose desquamaient, perdaient leur contour cellulaire et devenaient acidophiles. Cette nécrose des villosités entraînait leur érosion progressive se traduisant par un amas de débris cellulaires éosinophiles finissant par se détacher les uns des autres, exfoliant dans la lumière. Un raccourcissement des villosités était observé allant jusqu'à leur disparition totale.

Une fois les villosités acidophiles, elles disparaissaient peu à peu en laissant place à un amas de débris cellulaires éosinophile et finissaient par se détacher les unes des autres. L'ensemble des lésions évoquait un processus de putréfaction extrêmement rapide (Figure 16B et 16C).

Figure 16 : Coupe histologique transversale du duodénum d'une souris morte d'entérite nécrosante aiguë à un stade avancé.

(A-C) Coupe d'intestin à faible (A) et moyen (B et C) grossissement. (A) Perte totale de la conformation circulaire du segment d'intestin et exfoliation généralisée à toutes les couches intestinales, et décollement les unes des autres. Une portion ne présente plus que la musculuse et la séreuse avec un peu de mucus basophile accolé (flèche). (B-C) Perte d'organisation de la structure du duodénum, les villosités ne sont plus discernables. Exfoliation généralisée à l'ensemble des couches du duodénum. Les cellules acidophiles laissent place à un mucus basophile. Coloration hémalum-éosine-safran. Mosaïque au grossissement x20, barre d'échelle de 250 µm (A) et grossissement x20, barre d'échelle de 50 µm (B et C).



C. Etude étiologique : cultures bactériennes et RT-qPCR

a. Etude des causes bactériennes

- *Hypothèse d'une infection à Clostridium perfringens*

La mise en culture des échantillons s'est révélée négative pour l'ensemble des femelles allaitantes mortes d'ENA. La recherche par PCR de gènes de toxines n'a pas pu être réalisée étant donné la culture négative de *C. perfringens*.

- *Hypothèse d'une infection à C. piliforme - Maladie de Tyzzer*

- Extraction de l'ADN bactérien

Les valeurs de concentration et de pureté de l'ADN bactérien pour chaque échantillon ont été déterminées par spectrophotométrie Nanodrop (Tableau 6).

Tableau 6 : ADN extraits du contenu intestinal de six souris atteintes d'ENA

Echantillon	Concentration (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
F18-49-128 A2	568,9	1,90	2,26
F15-351-412 B2	460,4	1,90	2,33
F15-364-463 C2	151,7	1,87	1,61
F16-1210-28 4-2	252,5	1,88	1,60
F13-1133-1219 8-2	216,6	1,87	1,71
F17-1232-1331 10-2	290,2	1,88	2,30

- PCR nichée

Aucune PCR nichée n'a pu être réalisée dans la période prévue de ce projet.

b. Etude de causes virales par RT-qPCR

Pour chaque expérience, les données issues de la gamme de dilution et de chaque échantillon ont été analysées. En ce qui concerne la gamme, la valeur de Ct du puits le plus concentré, l'évolution de la valeur de Ct des puits suivants, l'efficacité et la température de fusion des amplicons ont été étudiées. Pour ce qui est des échantillons, les valeurs de Ct des duplicats et la température de fusion des amplicons ont été analysées.

- *Sélection d'échantillons calibrateur*

Concernant le couple d'amorces du gène astro 1, aucun résultat n'était obtenu : la réaction n'a pas fonctionné malgré plusieurs tentatives.

Concernant le couple d'amorces du gène astro 2, l'efficacité de la réaction était de 1,6. Le puits de gamme le plus concentré avait une valeur de Ct de 26 suggérant une concentration en AVM importante. Néanmoins, l'évolution de la valeur de Ct pour les puits de gamme dilués augmentait de façon irrégulière. La valeur de Ct de l'eau était nulle, garantissant l'absence de contamination. La courbe de température de fusion des amplicons comportait un pic unique à 75°C. En ce qui concerne les autres échantillons, la valeur de Ct était comprise entre 28 et 30 (Tableau 7).

Tableau 7 : Valeur de base du cycle seuil des six individus atteints d'entérite nécrosante aiguë pour les couples d'amorces astro 2 et noro 1.

Une valeur de Ct basse signifie que la fluorescence liée à l'ADN est détectée rapidement et témoigne d'une forte concentration initiale en virus. Ici, sur la base de la valeur de Ct, l'échantillon R1 présente une Ct basse pour les gènes astro et noro.

Echantillons	Ct pour astro 2	Ct pour noro 1
R1	26	26
R2	28	35
R3	28	32
R4	30	34
R5	29	34
R6	28	37

Concernant le couple d'amorces du gène noro 1, l'efficacité de la réaction était de 1,96. Le premier puits de gamme avait une valeur de Ct de 26 et la valeur des puits dilués augmentait d'un point de façon régulière. La valeur de Ct de l'eau était également nulle. Néanmoins, la courbe de température de fusion des amplicons comportait un double pic à 83 et 87°C. Les valeurs de Ct de l'individu R1 étaient de 26 et au-dessus de 30 pour les individus R2 à R6 (Tableau 7).

- *Ajustement de la température d'hybridation*

Face au manque de reproductibilité des résultats obtenus lors de l'étape de sélection du calibrateur, notamment une valeur de Ct pour le couple d'amorces astro 2 généralement supérieure à 30, la température d'hybridation de 56 °C a été testée.

Après changement de la température d'hybridation à 56°C, les puits les plus concentrés de chaque couple d'amorces présentaient une valeur de Ct augmentée : 40 cycles pour le couple d'amorces noro 1 et 36 pour astro 2.

- *Mise au point de la réaction de qPCR*

Après avoir renouvelé les dilutions des gammes et des couples d'amorces, certaines valeurs de Ct étaient répétables sur plusieurs réactions de qPCR.

La valeur de Ct du couple d'amorces noro 1 pour R1 était de 25 cycles et la courbe de fusion des amplicons montrait le même double pic que lors des précédentes réactions. Concernant le couple d'amorces noro 2, la valeur de Ct pour R1 était de 27 cycles et la courbe de fusion comportait également un double pic.

La réaction de qPCR pour le couple d'amorces astro 1 n'a jamais fonctionné. La valeur de Ct pour R1 du couple d'amorces astro 2 était de 28 cycles et l'efficacité de la réaction était de 1,77. La courbe de fusion comportait un seul pic à 85 °C. Concernant le couple d'amorces astro 3, la valeur de Ct pour R1 était de 30 cycles et la courbe de fusion comportait un double pic à 78 et 83 °C. L'efficacité de la réaction était de 2,45.

- *Contrôle de la taille des amplicons sur gel d'électrophorèse*

A plusieurs reprises, des contrôles de la taille des échantillons ont été effectués en fonction du profil de leur courbe de fusion.

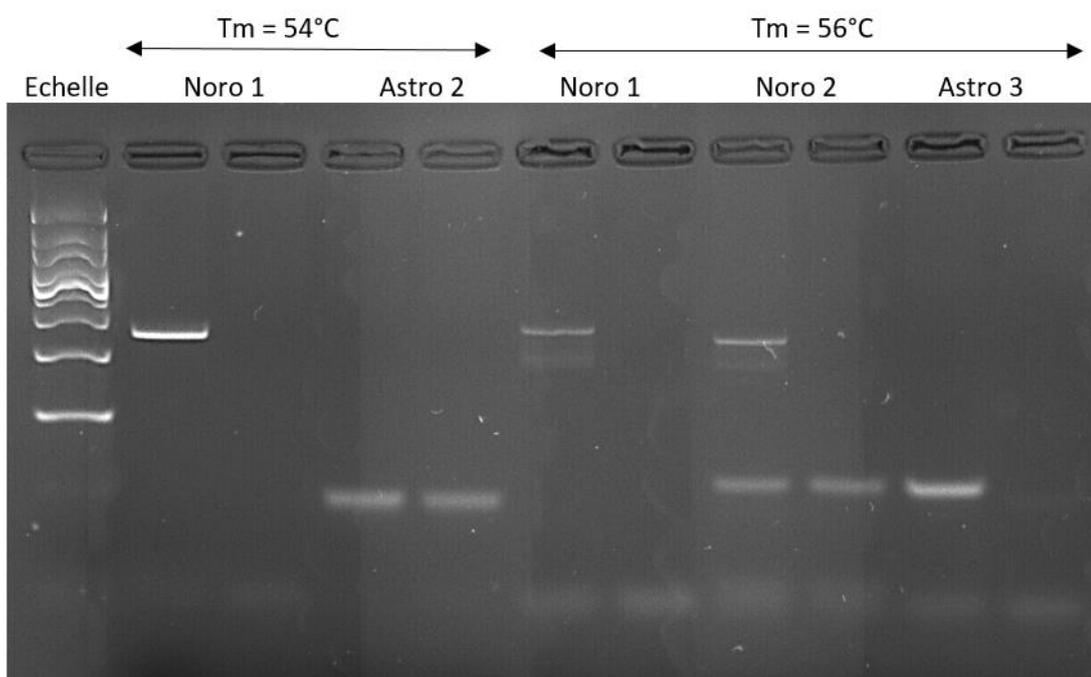
- Dépôts des amplicons issus des réactions d'ajustement de la température de d'hybridation des amorces

Les échantillons dont la courbe de fusion comprenait un double pic étaient déposés sur un gel d'électrophorèse afin de vérifier la pureté des séquences amplifiées.

Dans un premier temps, la taille des amplicons des amorces noro 1 et 2 était conforme la taille attendue d'environ 250 pb. Néanmoins, les amplicons des amorces astro 2 et 3 avaient une taille inférieure à 100 pb contre une taille attendue respectivement à 372 pb et 247 pb (Figure 17). Dans un second temps, on a observé que la bande des amorces noro 1 à une température d'hybridation de 54°C était plus intense que celle à 56°C pour le même couple d'amorces.

Figure 17 : Gel d'électrophorèse des amplicons issus des réactions d'ajustement de la température d'hybridation.

Dépôt sur gel d'électrophorèse des amplicons des gammes, réalisées à partir du calibrateur R1, ayant présenté un double pic et du témoin négatif. La réaction de qPCR sur la gauche de la figure a été réalisée avec une température d'hybridation de 54 °C et 56 °C pour la réaction de droite. Les bandes des couples d'amorces noro 1 et noro 2 se situent environ à 250 pb quel que soit la température d'hybridation (données pour le couple d'amorces noro 2 à une température d'hybridation de 54 °C non disponibles). Le double pic correspond à une seule séquence amplifiée. Les amplicons des amorces astro 2 et 3 ne contenaient pas de séquences d'intérêt : seuls les dimères d'amorces sont visibles après la bande témoin des 100 pb. D'autre part, la bande de l'amplicon des amorces noro 1 étaient plus intense lorsque la température d'hybridation était de 54°C.



□ Dépôt sur gel des amplicons issus des réactions de mise au point de la qPCR

Les échantillons supposés positifs par leur valeur de Ct et par le profil de leur courbe de fusion étaient déposés sur un gel.

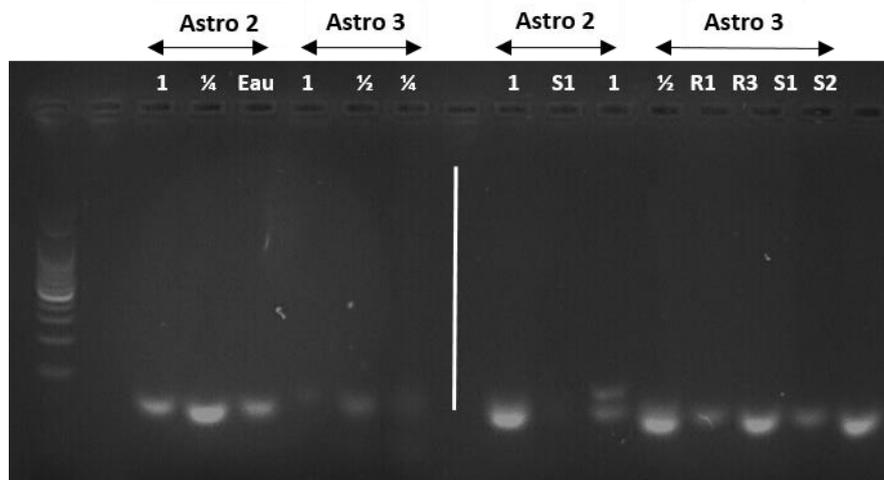
Concernant les amplicons astro 2 et 3, tous les amplicons des gammes de dilution ne dépassaient pas 100 pb ce qui indique qu'ils correspondaient à des dimères d'amorces (Figure 18A). Parmi l'ensemble des 12 échantillons testés, S4 présentait une bande de forte intensité et, R3 et S5 présentaient une bande de faible intensité à hauteur de la taille de l'amplicon astro 2. Néanmoins, aucune bande n'était présente à hauteur de la taille de l'amplicon astro 3 et dans les gammes correspondantes (Figure 18B).

Figure 18 : Dépôt sur gel d'électrophorèse des amplicons issus des différentes réactions de mise au point de la qPCR pour les couples d'amorces astro 2 et 3.

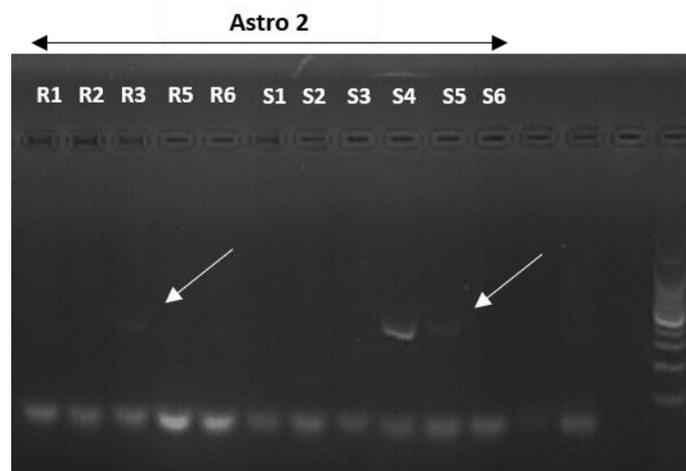
(A) Dépôt sur gel d'électrophorèse des amplicons des gammes réalisées à partir du calibrateur R1 et des certains échantillons, dont les valeurs de Ct associées à leur courbe de fusion évoquaient une positivité pour les amorces astro 2 et 3. Les amplicons sont issus de deux réaction de qPCR séparée par le trait blanc. Les deux réactions de qPCR ont été réalisées à une Tm de 54°C. Quelle que soit la réaction de qPCR et le couple d'amorces, les bandes sont inférieures à 100 bp indiquant que les amplicons détectés sont des dimères d'amorces.

(B) Dépôt sur gel d'électrophorèse des échantillons dont les valeurs de Ct associées à leur courbe de fusion évoquaient une positivité aux amorces astro 2. Parmi les échantillons d'individus atteints d'ENA, seul l'individu R3 présente une bande entre 300 et 400 bp. Parmi les échantillons des individus contrôles, les individus S4 et S5 présentent une bande de taille attendue pour astro 2 et 3. Les flèches blanches indiquent les bandes peu visibles sur le gel.

(A)



(B)

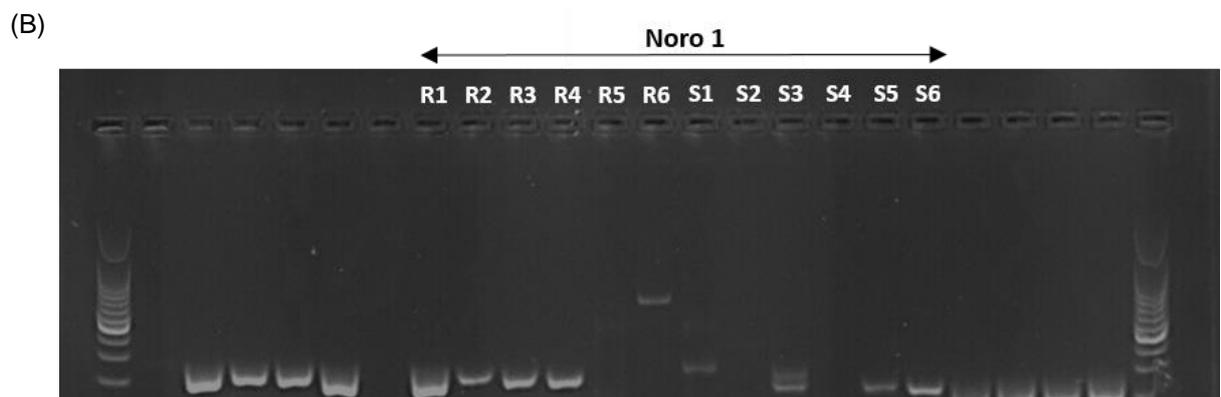
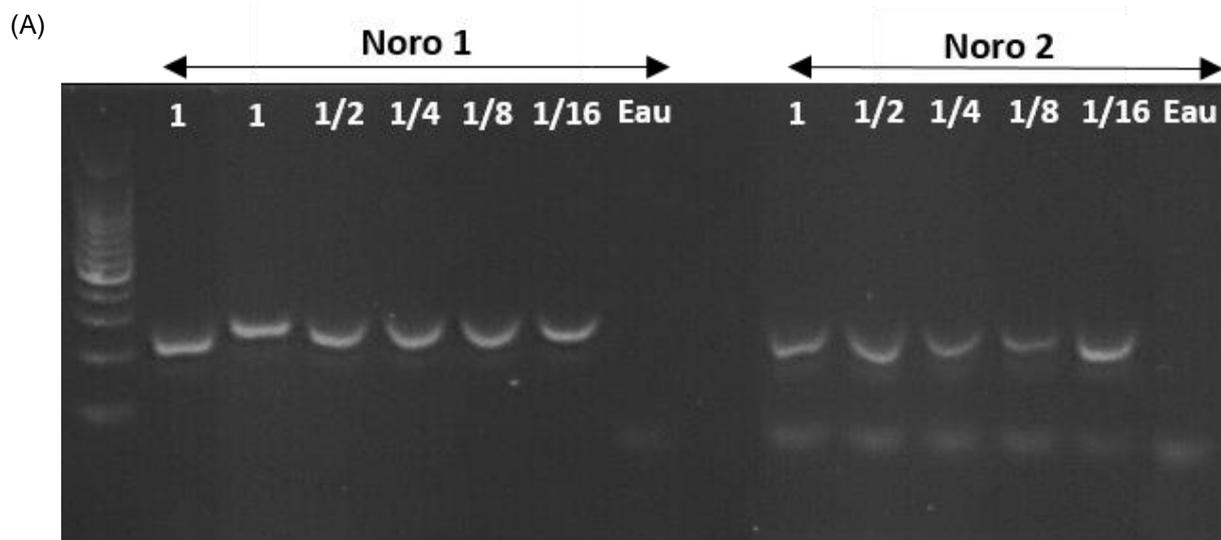


A l'inverse, en ce qui concerne les amorces noro 1 et 2, les amplicons des gammes de dilution réalisées avec l'échantillon R1 présentaient tous une bande à hauteur de la taille (Figure 19). Parmi l'ensemble des échantillons des individus atteints d'ENA testés, R1, R2, R3 et R4 présentaient une bande à la taille attendue pour noro 1. Parmi les échantillons contrôles, S1, S3, S5 et S6 présentaient une bande à hauteur de la taille attendue pour noro 1. Les échantillons n'ont pas été testés pour noro 2.

Figure 19 : Gel d'électrophorèse des amplicons issus des réactions de mise au point de la qPCR pour les couples d'amorces noro 1 et 2.

(A) Dépôt sur gel d'électrophorèse des amplicons des gammes, réalisées à partir du calibrateur R1, dont les valeurs de Ct associées à leur courbe de fusion évoquaient une positivité à noro 1 et 2. Les bandes des gammes des amorces se situent entre 200 et 300 bp comme attendu.

(B) Dépôt sur gel d'électrophorèse des amplicons des puits d'échantillons pour les amorces noro 1. Parmi les échantillons des individus atteints d'ENA, R1, R2, R3 et R4 présentent une bande à la taille attendue. Parmi les échantillons des individus contrôle, S1, S3, S5 et S6 présentent une bande à la taille attendue.



- *Recherche d'un échantillon calibrateur par PCR*

Suite à la découverte de l'absence d'amplicons des amorces astro 2 et 3 pour R1, un nouvel échantillon calibrateur, positif pour tous les couples d'amorces, a été recherché.

Le fonctionnement de la réaction de PCR était optimal comme en témoignent les bandes d'intensité importante du gène *Rpl32* et l'absence de bande pour l'eau (Figure 20).

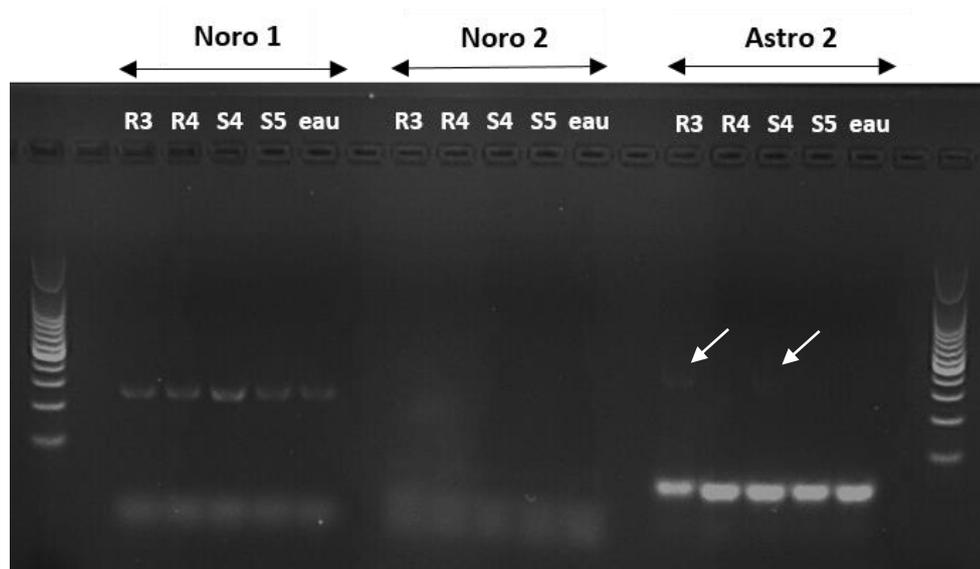
En ce qui concerne les amplicons noro, aucune bande n'était présente pour noro 2. A l'inverse, tous les échantillons testés avec les amorces noro 1 présentaient une bande à hauteur attendue. Néanmoins, le témoin négatif présentait également une bande à hauteur des autres échantillons et ne permettait pas une interprétation avec certitude (Figure 20).

En ce qui concerne les amplicons astro, aucune bande n'était présente pour le gène astro 3 (Figure 20). Seuls les échantillons R3 et S4 présentaient une bande à hauteur de la taille attendue pour astro 2. Les bandes des amplicons *Rpl32* se trouvaient en dessous de 100 pb.

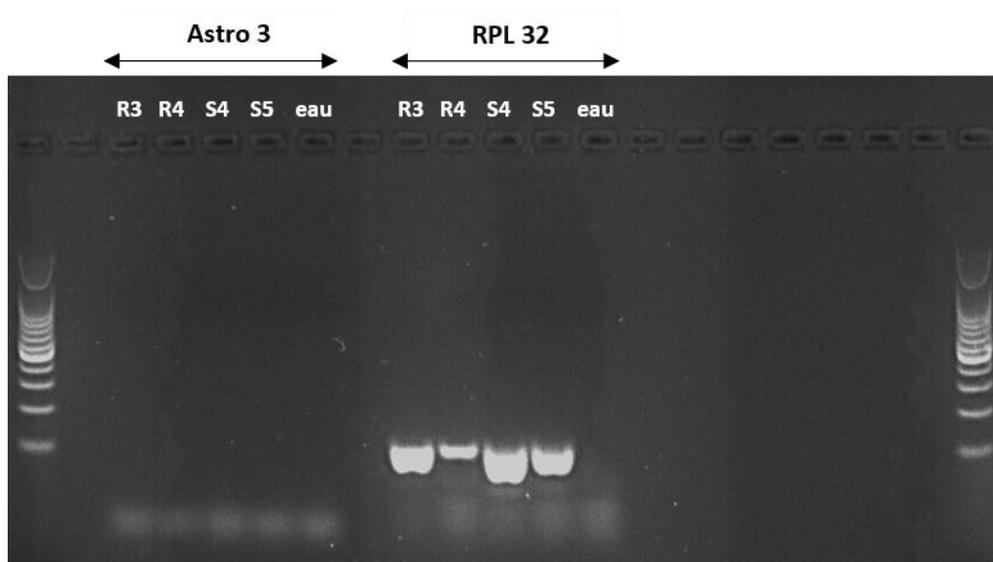
Figure 20 : Gel d'électrophorèse des amplicons issus de la réaction de PCR à partir des échantillons positifs pour au moins un des couples d'amorces lors des réactions de qPCR.

(A – B) Dépôts sur gel d'électrophorèse des amplicons obtenus après réaction de PCR sur les échantillons positifs lors des qPCR et confirmés par un dépôt sur gel d'électrophorèse. La température d'hybridation de la réaction était de 52°C afin d'amplifier le plus grand nombre de séquences d'ADNc et déterminer si certaines d'entre elles avaient la taille attendue. Les couples d'amorces noro 1 et 2, astro 2 et 3, et Rpl32 ont été testés pour les échantillons R3, R4, S4 et S5. (A) Les quatre échantillons et l'eau présentaient une bande pour le couple d'amorces noro 1. A l'inverse, les échantillons ne présentaient aucune bande pour le couple d'amorces noro 2. Ce résultat inattendu par rapport aux expériences précédentes laisse supposer une erreur de manipulation. L'échantillon R3 et S4 présentaient une bande pour le couple d'amorces astro 2 (flèches). (B) Aucun échantillon n'était positif pour astro 3. Les quatre échantillons présentaient une bande pour le gène *Rpl32*.

(A)



(B)



4. Discussion

La discussion sera divisée en deux parties : une première concernant les aspects techniques du projet et une seconde axée sur les résultats scientifiques et leur signification.

A. Discussion technique

Sur le plan technique, toutes les études ont comporté des aléas de réalisation.

a. Recherche bibliographique

En l'absence de consensus concernant l'appellation de la lésion, la recherche bibliographique a été difficile et nous a conduits à démarrer le projet avant de prendre en compte *C. perfringens* et *C. piliforme* dans notre étude. Les prélèvements ont ainsi été réalisés sans prendre de précautions pour les protéger de l'oxygène ou éviter la congélation.

b. Qualité de la base de données

Dans la mesure où nous avons besoin d'une base de données la plus fiable possible, elle a été réalisée à partir de fichiers de génotypage sur un tableur *Excel*. Des vérifications ont également été faites une fois la base remplie afin d'éliminer toutes les erreurs. D'autre part, la rigueur de travail du technicien qui s'est occupé de rédiger les génotypages à partir de l'année 2018 nous a permis d'obtenir un haut degré de confiance quant aux données récoltées depuis cette date. Enfin, nos données finales ont été vérifiées grâce aux comparaisons des différents documents à notre disposition : feuille de suivi quotidien, cahier d'élevage et feuille d'autopsie. Ce travail a nécessité un très long travail mais a permis d'aboutir à une base précise et fiable.

c. Contraintes liées à l'analyse statistique

Certains échantillons n'étaient pas de taille suffisante pour réaliser une analyse statistique fiable. C'est le cas de la comparaison des distributions des souris en fonction de l'occurrence de l'ENA chez la mère de la femelle allaitante dont un des groupes ne comportait aucun individu. Une correction d'Haldane-Anscombe a néanmoins permis d'inférer à la population cible.

d. Autopsie et méthode de prélèvement

Afin de limiter tout artéfact, seuls les individus euthanasiés ou morts depuis peu de temps ont été autopsiés et prélevés. D'autre part, les individus présentant un degré de putréfaction avancé étaient systématiquement exclus. Enfin, la bonne qualité des échantillons d'intestin pour l'histologie était garantie par le rinçage au formol des prélèvements chez les individus euthanasiés.

e. Préparations histologiques

Les coupes histologiques comprennent parfois quelques artéfacts de préparation : des stries liées à la coupe parcourent l'ensemble du segment d'intestin et les couches intestinales ne sont pas toujours correctement accolées les unes aux autres.

f. Méthodes de détection utilisées dans l'exploration d'une origine infectieuse

Les méthodes de détection des agents infectieux potentiellement mis en cause ont été réfléchies en concertation avec des spécialistes en virologie et en bactériologie au fur et mesure des résultats des études préliminaires. L'hypothèse d'une origine bactérienne ayant été envisagée tardivement, certaines recherches d'agents pathogènes n'ont pas pu être effectuées dans des conditions optimales.

- *Exploration d'une hypothèse à C. perfringens*

- Mise en évidence de *Clostridium perfringens*

Dans un premier temps, l'exploration histologique d'une cause infectieuse a été limitée à une coloration HES. D'autres colorations auraient été préférables pour la recherche d'agent bactérien comme une coloration de Gram ou Giemsa.

Ensuite, la mise en culture d'échantillons de jéjunum de femelles mortes d'ENA s'est révélée négative pour chacun des prélèvements. Ces observations, associées à l'absence de lésions histologiques caractéristiques nous permettent pratiquement de conclure en l'absence d'implication de *C. perfringens* dans l'affection qui a touché notre colonie. Néanmoins, les autopsies réalisées en amont de ce projet de recherche n'ont pas été pratiquées dans des conditions idéales à l'exploration d'un germe anaérobie. Bien que *C. perfringens* soit aéro-tolérant, la préservation par rapport à l'oxygène ne peut être garantie. Il aurait été préférable de réaliser ces autopsies sous atmosphère azotée et de stocker une partie des prélèvements dans du glycérol. D'autre part, même si *C. perfringens* est tolérant au contact de l'air la congélation entraîne sa mort et ne permet plus son identification.

Enfin, la réalisation d'une recherche de toxines par un dosage ELISA constitue une alternative à la détection des toxines par PCR. Néanmoins, le diagnostic de *C. perfringens* à partir de ses toxines doit être interprété avec précautions. Par exemple, CPtB est difficile à mettre en évidence du fait de sa similarité avec CPtD et de la fragilité de la toxine β . Ainsi, CPtB est peut-être sous diagnostiqué au profit de CPtD par la mise en évidence des toxines α et ϵ lors de dégradation de la toxine β (Uzal *et al.*, 2016).

Bien que l'hypothèse d'une infection à *C. perfringens* semble peu probable compte tenu du faisceau d'indices convergeant vers une hypothèse virale, nous devons considérer que les formes végétatives ont possiblement été altérées par le processus de congélation. Le diagnostic définitif de *C. perfringens* est particulièrement difficile et ne peut, en théorie, être établi qu'en regroupant les données cliniques, lésionnelles associées à la mise en évidence de l'agent pathogène et ses toxines.

- *Exploration d'une hypothèse à C. piliforme*

Le diagnostic de la maladie de Tyzzer est difficile à établir compte tenu du caractère intracellulaire de *C. piliforme*. Il repose d'une part, sur l'observation macroscopique de lésions caractéristiques au niveau du foie, de l'iléon, du caecum et parfois du cœur. D'autre part, il est fondé sur la visualisation de clostridies à l'intérieur de cellules situées en périphérie des lésions nécrotiques pour laquelle une coloration de *Warthin-Starry* aurait été préférable (Uzal *et al.*, 2016). Néanmoins, l'histologie ayant montré un manque de sensibilité sur des lapins d'élevage (Normand *et al.*, 2005), la méthode d'identification par PCR nichée est à privilégier du fait de sa sensibilité plus élevée.

Compte tenu du manque de temps pour réaliser ce projet et ne disposant pas de souche de référence de *C. Piliforme* comme contrôle positif, cette exploration n'était pas réalisée. D'autres part, nos PCR nichées devaient être réalisées à partir d'échantillons de duodénum bien que la littérature recommande de les réaliser à partir d'échantillons de foie ou de caecum (Niepceron, 2007). Une extraction des ADN bactériens à partir du caecum pourrait favoriser la mise en évidence de *C. piliforme*.

- *Exploration d'une hypothèse virale à astrovirus et norovirus*

Classiquement, la sérologie est une méthode de choix pour la mise en évidence indirecte d'agents pathogènes du fait de leur présence dans le sang une fois les antigènes éliminés. L'utilisation de

test sérologiques (Schmidt *et al.*, 2017) aurait permis de détecter les individus ayant été au contact de l'AVM et du NVM. D'autre part, des sondes d'hybridation *in situ* auraient également permis d'observer de façon indirecte la présence d'AVM afin de présélectionner les individus positifs pour l'AVM (Cortez *et al.*, 2019).

Néanmoins, la RT-qPCR constitue une méthode de choix.

Dans un premier temps, son efficacité était garantie par l'étude préliminaire réalisée à l'Institut Pasteur. Ensuite, elle permettait la détection directe d'acides nucléiques, ce qui convient davantage à notre situation. Etant donné la mort soudaine des femelles de notre colonie, les virus, s'ils sont en cause, ne sont pas éliminés et leur présence est garantie. Le second intérêt était de précisément quantifier chaque type de virus afin d'obtenir un ordre de grandeur de la charge virale dans chaque échantillon en la comparant aux gènes de ménage.

Dans un second temps, la RT-qPCR permettait d'optimiser la méthode de détection. Les souris mortes d'ENA présentaient généralement une lyse avancée de l'intestin. Or, les amorces de RT-qPCR permettaient de répliquer de courtes séquences d'ARN plus adaptées à des séquences en partie dégradées. Par ailleurs, sa sensibilité est proche de 100%.

Enfin, ces virus persistent plusieurs semaines à plusieurs mois après l'infection (Compton *et al.*, 2017; Hsu *et al.*, 2005). La RT-qPCR permet de mettre en évidence les séquences virales chez des individus contrôles asymptomatiques.

g. Réalisation des RT-qPCR

La réalisation des qPCR a été la partie la plus problématique de ce projet si bien qu'aucune conclusion étiologique ne peut être tirée des expériences réalisées. La mise au point des réactions de qPCR n'a jamais été optimale et la quantification relative de la charge virale n'est donc pas interprétable. Néanmoins, plusieurs informations ont pu être récupérées et certaines difficultés ont pu être identifiées.

- *Séparation des étapes de qPCR*

Chaque étape de RT-qPCR a été réalisée dans un lieu dédié pour éviter toute contamination. Chaque aire de travail contenait son propre matériel. De plus, les étapes de préparations, d'amplification et d'analyse ont été réalisées dans des pièces différentes. L'application du principe de marche en avant a été respectée de l'aire de pré-amplification à l'aire de post-amplification.

- *Dégradation et taille insuffisante des échantillons d'intestin*

L'ARN de certains échantillons n'a pas pu être récupéré à cause d'une dégradation excessive. D'une part, quelques prélèvements étaient inférieurs au 50 mg recommandé pour l'extraction d'ARN, pour certains individus.

- *Identification de potentielles contaminations*

Le contrôle de potentielles contaminations s'est déroulé à chaque étape, de l'extraction à la réaction de qPCR.

- Dosage des ARN et mesure de pureté

La pureté des ARN après extraction a systématiquement été contrôlée. Une contamination protéique est mise en évidence par une valeur du ratio A260/A280 inférieure à deux. Une valeur du ratio A260/A230 inférieure à 2,0 – 2,2 témoigne d'une contamination par des composés utilisés lors de l'extraction, notamment l'éthylènediaminetriacétate (EDTA) ou encore des composés présents dans

le *Trizol Reagent* tels que le phénol ou le thiocyanate de guanidium. Lors de contaminations, une méthode de précipitation permettait de purifier nos ARN.

□ Utilisation de contrôles négatifs

Les plaques de RT-qPCR comprenaient systématiquement des contrôles négatifs avec des puits contenant l'ensemble des réactifs sans ADNc de l'échantillon d'intérêt.

- *Amélioration du protocole de qPCR par l'ajustement de la température de fusion des amorces*

La température d'hybridation des amorces a été optimisée afin d'obtenir une amplification maximale pour chacun des gènes. Dans un premier temps, les valeurs de Ct de noro 1 et des données issues de la migration des amplicons de l'expérience d'ajustement de la température d'hybridation sur un gel d'électrophorèse ont confirmé que la température optimale était de 54°C. Dans un second temps, la migration des amplicons sur un gel d'électrophorèse a permis de confirmer que les séquences amplifiées correspondaient aux amplicons noro 1 et 2 et le profil type de la courbe de fusion de noro 1 et 2 qui comportait un double pic a été validé.

- *Aléas relatifs à la réaction de qPCR*

Plusieurs éléments relatifs à la réaction de qPCR ont été identifiés.

□ Amorces défectueuses

Compte tenu du fort potentiel de mutation de ces virus et de leur polymorphisme, plusieurs amorces étaient nécessaires pour amplifier un maximum de séquences possiblement fragmentées du virus d'intérêt. Or parmi les amorces issues de l'étude de l'Institut Pasteur, le couple d'amorces astro 1 n'a jamais fonctionné dans notre laboratoire.

□ Conséquences de l'erreur du choix de l'échantillon calibrateur

Le choix de l'échantillon calibrateur constituait une étape cruciale dans la réalisation des gammes de dilution qui permettaient ensuite d'extrapoler et comparer les quantités relatives de virus. Le dépôt sur gel des amplicons issus des réactions de mise au point des qPCR a permis de révéler la mauvaise direction prise dans ce projet depuis l'étape de sélection de l'échantillon calibrateur.

Dans un premier temps, la migration des amplicons sur un gel d'électrophorèse des couples d'amorces astro 2 et 3, issus de l'expérience d'ajustement de la température d'hybridation, a révélé l'absence de séquence d'intérêt pour ces gènes. Il a d'abord été supposé que des contaminations des amorces ou des erreurs de dilution étaient à l'origine de cette absence. Cette hypothèse était basée sur la valeur de Ct du point de gamme le plus concentré de l'amplicon astro 2 dans l'étape de sélection de l'échantillon calibrateur, de 26 cycles, identique à noro 1 et le profil de la courbe de fusion à un pic.

Dans un second temps, les contrôles sur gel des expériences de mise au point de la qPCR ont ensuite montré que les amplicons issus des couples d'amorces astro 2 et correspondaient à des dimères d'amorces. La suite du projet requerrait donc une recherche de l'échantillon calibrateur pour les amplicons astro 2 et 3 parmi les autres échantillons d'individus atteints d'ENA. Pour cela

A l'inverse, le dépôt des amplicons des gammes de dilution des amplicons noro 1 et 2, réalisées à partir de l'échantillon R1, a systématiquement révélé l'amplification de séquences d'intérêt. L'échantillon R1 était donc un bon calibrateur pour les amplicons noro.

B. Discussion scientifique

Plusieurs difficultés techniques nous ont empêchés de mener ce projet à son terme et de conclure quant à nos hypothèses de départ. Néanmoins, de nombreuses informations ont été obtenues et les résultats sont discutés ci-dessous.

a. Etude épidémiologique

La base de données a permis de déterminer s'il existait une association causale entre les expositions étudiées (âge, rang de parité, taille des portées, occurrence d'ENA chez la mère de la femelle, occurrence d'ENA selon le mâle d'accouplement) et la survenue d'ENA.

- *Age*

Dans la population de souris entre la 2^e et 3^e semaine de lactation de l'animalerie étudiée, il y a des chances qu'il n'existe pas de d'association réelle entre l'âge et l'ENA, et donc que l'âge ne soit ni un facteur de risque ni un facteur protecteur de l'ENA.

- *Rang de parité*

Dans la population de souris entre la 2^e et 3^e semaine de lactation de l'animalerie étudiée, il y a des chances qu'il n'existe pas d'association réelle entre le rang de parité et l'ENA, et donc que le rang de parité ne soit ni un facteur de risque ni un facteur protecteur de l'ENA.

D'autre part, le fort pourcentage de femelles primipares affectées dans notre étude (80%) et également dans plusieurs publications (Clifford et Pritchett-Corning, 2012; Krugner-Higby *et al.*, 2006) est probablement lié à un biais de sélection du fait de la gestion des lignées qui implique davantage de femelles primipares et qu'une proportion importante d'entre elles mouraient ici d'ENA avant un deuxième accouplement. D'autre part, les femelles étaient généralement mises à l'accouplement une seule fois dans notre colonie.

- *Taille des portées*

Plusieurs études ont mis en avant l'hypothèse qu'une large portée constituait un facteur de risque pour l'ENA. Les femelles les plus affectées avaient généralement une large portée (Kunstýř 1986; Krugner-Higby *et al.* 2006 ; Dagnaes-Hansen *et al.* 2010) et présentaient parfois peu de graisse abdominale à l'autopsie. D'autre part, la demande excessive en énergie due au nombre important de souriceaux est augmentée par le pic de demande énergétique au 14^e jour de lactation (Krugner-Higby *et al.*, 2006).

Néanmoins, notre étude statistique ne corrobore pas cette hypothèse. Dans la population de souris entre la 2^e et 3^e semaine de lactation de l'animalerie étudiée, il y a des chances qu'il n'existe pas de d'association réelle entre la taille de la portée et la survenue d'une ENA, et donc que la taille de la portée ne soit ni un facteur de risque ni un facteur protecteur de l'ENA.

- *Occurrence d'entérite nécrosante aiguë chez la mère de la femelle*

Toutes les souris allaitantes dont la mère était morte d'une ENA ont également été atteintes d'une ENA. Dans la population de souris entre la 2^e et 3^e semaine de lactation de l'animalerie étudiée, il y a de grandes chances pour qu'il existe une association réelle entre la survenue d'une ENA chez la mère de la femelle allaitante et la survenue d'une ENA, et donc que la survenue d'une ENA chez la mère de la femelle allaitante soit un facteur de risque de survenue d'ENA chez les souris allaitantes.

Néanmoins, il y a 95% de chance que la valeur réelle de l'odd ratio se situe entre 9,5 et 3093,1 ce qui rend son estimation peu précise.

- *Occurrence d'entérite nécrosante aiguë selon le mâle d'accouplement*

Dans la population de souris entre la 2^e et 3^e semaine de lactation des animaleries de laboratoire en France, il est peu probable que le mâle d'accouplement ait transmis l'ENA et fût un facteur de risque de survenue d'ENA chez les souris allaitantes. La transmission de la maladie n'est donc probablement pas sexuelle.

- *Occurrence d'entérite nécrosante aiguë chez la femelle adoptive*

L'occurrence de l'ENA chez les femelles ayant adopté des souriceaux issus de souris mortes d'ENA aurait pu être étudiée afin de déterminer l'implication de ces adoptions dans la transmission de l'ENA. Néanmoins, faute de données suffisantes, nous n'avons pas pu analyser cette exposition.

b. Caractérisation histologique des lésions

Cette partie vise dans un premier temps à décrire les lésions microscopiques et proposer une appellation pour la lésion. Dans un second temps, les indices récoltés à partir de ces coupes seront exposés.

- *Stades lésionnels et progression des lésions*

Trois stades lésionnels se distinguaient en fonction du degré d'évolution de l'ENA dont la progression était proximo-distale, du duodénum au gros intestin.

- Stade débutant

L'observation de lésions au stade débutant était très rare à cause de la difficulté d'identification d'individus au stade précoce de la maladie. Néanmoins, l'une de nos souris du groupe contrôle ayant présenté des signes cliniques évocateurs d'une ENA nous a permis de prélever l'intestin et de réaliser un rinçage à l'aide d'une solution de formol. Bien que l'autopsie n'ait révélé aucune anomalie, l'observation histologique a permis d'observer les lésions précoces de la maladie. Au stade débutant, seul le duodénum est affecté. Contrairement aux souris contrôles, l'épithélium de la muqueuse duodénale de la souris euthanasiée présentait en partie distale une discrète exfoliation. La sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse ne présentaient aucune lésion à ce stade. D'autre part, le jéjuno-iléon et le gros intestin de la souris à un stade précoce de la maladie étaient similaires aux souris contrôles.

- Stade intermédiaire et avancé

Chez les souris mortes d'ENA, différents stades lésionnels ont été observés. Ces lésions évoquent un processus de putréfaction avancée. Néanmoins, ces lésions étaient observées chez les souris prélevées immédiatement après leur euthanasie. Un processus nécrotique serait ainsi à l'origine de la mort des femelles allaitantes.

Possible association du degré de lyse intestinale à deux schémas lésionnels

Les deux schémas lésionnels observés semblent être évocateurs du degré de lyse intestinale.

A l'autopsie, le duodénum était systématiquement nécrosé et le segment le plus atteint. En microscopie optique, il présentait une perte d'organisation structurelle sévère associée à une érosion

sévère des villosités et à des amas de débris cellulaires issus des cellules nécrosées dans la lumière intestinale emprisonnées dans du mucus basophile dans la lumière intestinale.

Distalement, le jéjunum était souvent moins altéré à l'autopsie. D'un point de vue histologique, la conformation circulaire du segment intestinal était conservée mais on distinguait difficilement l'organisation en couches. Un schéma lésionnel différent et d'aspect plus précoce était observé : les cellules épithéliales nécrosent et deviennent éosinophiles aux contours cellulaires flous et étaient associées à une exfoliation et un raccourcissement des villosités. La muqueuse et la sous-muqueuse disparaissaient peu à peu mais des cellules viables étaient présentes dans les couches intestinales les plus basales qui conservaient leur organisation.

Lors de stades avancés, les deux schémas lésionnels étaient associés à une désorganisation progressive. D'une part, les cellules des couches les plus centrales semblaient également nécroser pour ensuite former des débris dans un mucus basophile. D'autre part, les couches se détachaient les unes des autres avant la destruction complète des cellules de la muqueuse et de la sous-muqueuse. Paradoxalement, ces lésions ne s'accompagnaient jamais de signes d'inflammation ou d'hémorragie fréquents lors d'entérites.

Enfin, le gros intestin était jamais lésé à l'autopsie. Au niveau histologique, le gros intestin conservait sa conformation et son organisation structurale. Néanmoins, il présentait des lésions similaires moins marquées : une discrète exfoliation de l'épithélium et un décollement de la musculature.

Agents bactériens parfois observés

Plusieurs segments ont permis la mise en évidence de bacilles dans la lumière intestinale et la muqueuse. Néanmoins, ces observations ne permettent aucune conclusion étiologique à ce stade. Ces aspects seront discutés ci-dessous.

Proposition de nom

En concertation avec le Dr Edouard Reyes-Gomez, le terme d'entérite nécrosante aiguë a été proposé pour décrire cette maladie qui touche les femelles allaitantes.

c. Conclusion étiologique

A ce stade du projet, il n'est pas possible de conclure quant à l'étiologie de l'ENA sans les résultats des RT-qPCR. Seules des hypothèses seront émises et des arguments en faveur d'un agent pathogène ou de son exclusion seront proposés.

• Arguments en faveur de l'exclusion d'une infection à *C. perfringens*

L'affection qui a touché notre colonie de souris se rapproche de la description réalisée par Feinstein et al. (2008) sur les aspects épidémiologiques, cliniques et lésionnels. De plus, notre étude histologique a permis de caractériser des lésions microscopiques similaires. Néanmoins, contrairement à cette étude, nous n'avons pas observé *C. perfringens* dans nos échantillons bien que plusieurs segments de souris atteintes d'ENA aient permis la mise en évidence de bacilles dans la lumière intestinale et la muqueuse. Compte tenu de la présence de bactéries dans l'intestin et du possible développement d'une population bactérienne secondaire à une infection, ces observations ne permettent aucune conclusion à ce stade.

Par ailleurs, certains éléments cliniques et lésionnels associés aux différents types de *C. perfringens* ne ressemblent pas aux observations faites dans notre colonie. La responsabilité de *C. perfringens*

lors d'ENA dans notre colonie est peu probable. Les différences et les similarités pour chacun des types sont développées ci-dessous.

□ CPTA

Certaines descriptions d'infections à CPTA évoquent une érosion des villosités similaire aux lésions présentes chez nos souris, débutant en partie apicale pour rejoindre la base (Freedman *et al.*, 2018). Néanmoins, le rôle de CPTA lors de maladies digestives est controversé compte tenu de son caractère ubiquitaire, sa présence dans le tube digestif d'individus sains (Mehdizadeh Gohari *et al.*, 2021) ou encore l'action cutanée et musculaire de la toxine α . D'autre part, l'inoculation intra-duodénale de CPTA chez des souris *Balb/c* ne provoque pas leur mort (Uzal et McClane, 2011).

Par ailleurs, une seule publication décrit une infection à CPTA chez une colonie de femelles allaitantes (Krugner-Higby *et al.*, 2006). En coloration HES, leur intestin comporte des hémorragies et une nécrose des villosités qui ne sont pas compatibles avec nos descriptions. En coloration de Gram, ces lésions sont associées à la mise en évidence de bacilles à proximité des lésions et la toxine α a été isolée par PCR. Néanmoins, le diagnostic d'une infection à CPTA est difficile du fait de la capacité de synthèse de la toxine α par l'ensemble des types de *C. perfringens*.

Enfin, les lésions de gastroentérites hémorragiques rapportées chez le chien ou d'entérocolites nécrosantes chez le poulain ne correspondent pas aux lésions observées chez nos souris.

□ CPTB

Une étude décrit une infection à CPTB de façon exhaustive chez des souris de laboratoire grâce à la réémergence d'une épizootie s'étant produite quelques années auparavant (Rozengurt et Sanchez, 1999). A l'image de nos souris, des signes cliniques secondaires à la douleur et une distension abdominale sont décrits. Néanmoins, les signes cliniques respiratoires et les lésions observées à l'autopsie n'ont pas été observés dans notre colonie. Au niveau du système digestif, de multiples adénomes situés au sein de l'épithélium des cryptes parcourent le duodénum. Des lésions cardiaques et pulmonaires ont également été mises en évidence.

Ces éléments se retrouvent d'un point de vue histologique. Une infection à CPTB provoque une nécrose de coagulation et une hémorragie de la muqueuse intestinale associées à la présence de membranes fibrineuses. Les cellules du duodénum sont basophiles avec un large noyau. Seul l'iléon comporte des zones d'entérite nécrosante avec des villosités raccourcies et une hyperplasie des cryptes. De nombreuses bactéries non sporulées à Gram positif sont présentes au niveau de la lumière et du tissu intestinal nécrotique.

Néanmoins, le diagnostic d'infection à CPTB est compliqué par la fragilité de la toxine β dans l'environnement digestif. Idéalement, le diagnostic devrait passer par la mise en évidence un développement de *C. perfringens* en culture, la présence de toxines β et ϵ , ainsi que des signes cliniques et des lésions compatibles. L'absence de détection de la toxine β conduit à un diagnostic erroné d'infection à *C. perfringens* de type D (CPTD).

□ CPTC

Les infections à CPTC font l'objet d'études sur modèles murins du fait de leur gravité dans les espèces de rente. La toxine ϵ jouerait un rôle majeur dans la toxicité de CPTC. A l'image de notre colonie, les souris étudiées étaient prostrées et souffraient d'une distension abdominale associée à une dilatation de l'intestin grêle ou mouraient rapidement par entérotoxémie (Uzal et McClane, 2011). D'autre part, les lésions histologiques correspondent à des entérites nécrosantes voire des

entérocolites évoluant de la pointe des villosités de l'intestin grêle ou de l'épithélium muqueux du gros intestin vers la périphérie. Néanmoins, le côlon et le caecum sont dilatés et le myocarde est œdématisé. De plus, les signes cliniques respiratoires et neurologiques observés ne sont pas compatibles avec notre colonie.

□ CPtD

Une infection à CPtD dans notre colonie est peu probable. Dans un premier temps, les infections à CPtD chez les ovins sont associées à un brusque changement de régime alimentaire, ce qui n'était pas le cas dans notre animalerie. Dans un second temps, CPtD provoque des signes cliniques respiratoires et neurologiques par entérotoxémie à condition que la charge en CPtD soit élevée (Fernandez-Miyakawa *et al.*, 2007b). A l'autopsie, une entérite nécrotico-hémorragique de l'intestin grêle et du côlon est rapportée (Matsushita et Matsumoto, 1986), ainsi qu'une encéphalomalacie symétrique focale, peu fréquente mais pathognomonique des infections à CPtD (Finnie, 1984).

D'un point de vue histologique, CPtD n'altère pas la muqueuse intestinale. Chez des souris *BALB/c* infectées par CPtD par voie gastrique et dont l'anus a été obstrué avec de la glue, seul un raccourcissement des villosités est observé (Fernandez-Miyakawa *et al.*, 2007b). De plus, l'altération des villosités n'a pas été observée chez les souris dont l'anus n'était pas obstrué et dont le transit était plus rapide. Enfin, de la trypsine administrée par voie orale augmente la létalité ce qui suggère que la quantité de trypsine naturellement présente ne permet pas d'activer suffisamment la toxine ϵ pour altérer l'épithélium.

□ CPtE

Les infections à CPtE sont peu documentées chez la souris. Néanmoins, les signes cliniques et les lésions associées chez d'autres espèces diffèrent de nos observations. Dans un premier temps, les signes cliniques semblent affecter les nouveau-nés chez les animaux de rente et les entérites associées sont hémorragiques. Ensuite, les descriptions histologiques ne correspondent pas aux observations de notre colonie. Une altération de la muqueuse se manifeste par un raccourcissement et une fusion des villosités suite à la nécrose sévère de l'épithélium intestinal. Par contre, ces lésions s'accompagnent de pseudomembranes et de l'infiltration de polynucléaires neutrophiles non observées dans notre colonie (Redondo *et al.*, 2017).

□ CPtF

Depuis 2018, CPtF, anciennement CPtA, correspond au type de *C. perfringens* qui synthétise les toxines α et la CPE. Ce type est à l'origine de toxi-infections alimentaires chez l'Homme qui ont conduit à la réalisation de nombreuses études sur modèles murins.

Certaines caractéristiques de la CPE pourraient correspondre à ce que nous avons observé dans notre colonie. CPE est capable d'engendrer des entérotoxémies qui à forte concentration entraînent la mort dans plus de 60% des cas (Caserta *et al.*, 2011). La CPE peut aussi agir localement en altérant l'épithélium intestinal : l'injection *in vitro* de CPE conduit d'une desquamation et une nécrose épithéliale sévère qui conduisent à une perte de structure des villosités (Navarro *et al.*, 2018). Néanmoins, les infections à CPtF sont majoritairement décrites chez l'Homme et sont létales dans certains contextes particuliers. D'autre part, les lésions s'accompagnent d'une infiltration neutrophilique dans la muqueuse, la sous-muqueuse et la lumière intestinale non retrouvée dans notre colonie.

□ CPTg

Le rôle pathogène de CPTg s'exprime principalement par la toxine NetB et affecte uniquement les volailles (Keyburn *et al.*, 2008). Par ailleurs, les lésions ne correspondent pas à celles observées dans notre colonie. Cette toxine engendre une réaction inflammatoire importante, caractérisée par une forte infiltration cellulaire et l'apparition de matériel fibrino-nécrotique à l'origine de pseudomembranes (Cooper *et al.*, 2013).

• *Arguments en faveur de l'exclusion de la maladie de Tyzzer*

L'infection de nos souris par *C. piliforme* est peu probable au sein de notre colonie. Les femelles mortes de l'étude de Feinstein *et al.* (2008) étaient exemptes de *C. piliforme* et les descriptions histologiques ne correspondaient pas à celles de la maladie de Tyzzer. Néanmoins, certaines similarités épidémiologiques et cliniques impliquent de l'intégrer dans notre diagnostic différentiel.

A l'image de nos souris, la maladie de Tyzzer se manifeste par une mort soudaine sans signe d'appel. Une forme aiguë est également décrite et s'accompagne d'une prostration associée à une réticence à se déplacer et d'épisodes de diarrhée aqueuse profuse ou d'une souillure de la zone péri-anale. Par contre, la maladie de Tyzzer est généralement asymptomatique chez les souris immunocompétentes. Elle peut tout de même entraîner des signes cliniques chez les jeunes au moment du sevrage, les individus immunodéficients ou lors de co-infections avec un autre agent pathogène (Uzal *et al.*, 2016).

Néanmoins, la distension abdominale systématiquement décrite dans notre colonie n'est pas rapportée chez la souris (Clifford et Pritchett-Corning, 2012) mais uniquement chez le rat (Uzal *et al.*, 2016). De plus, les lésions sont presque systématiquement localisées au niveau du foie et du caecum, parfois sur l'intestin grêle ou le cœur alors que l'ENA implique toujours l'intestin sans affecter les autres organes.

D'un point de vue histologique, plusieurs éléments décrits ci-dessous ne sont pas retrouvés chez nos souris. Le foie comporte des zones de nécrose de coagulation ou de nécrose caséuse multifocale qui s'accompagne d'une infiltration neutrophilique (Uzal *et al.*, 2016). En coloration May-Grünwald Giemsa ou de Steiner, *C. piliforme* est visible en marge des foyers nécrotiques et dans le cytoplasme des hépatocytes. Une infection chronique conduit à une évolution des lésions vers des granulomes, une fibrose ou une minéralisation du tissu. Le cœur comporte des lésions de dégénérescence et de nécrose. Au niveau intestinal, *C. piliforme* est visible dans les entérocytes à proximité de multiples foyers de nécrose, de dégénérescence ou d'œdèmes dans la muqueuse et la sous-muqueuse.

• *Arguments en faveur d'une infection à astrovirus ou norovirus murins*

Comme évoqué précédemment, l'absence de résultats de qPCR interprétables ne permet pas de conclure sur la potentielle origine virale de l'ENA dans ce projet. Les conclusions seront tirées dans un projet ultérieur bien que certaines informations aient pu être réunies au cours de nos recherches.

□ Contradictions entre la littérature et nos hypothèses virales

Le séquençage de Sanger réalisé par l'Institut Pasteur permet de suspecter une implication forte de l'AVM dans l'ENA et un rôle possiblement secondaire du NVM. Néanmoins, notre recherche bibliographique montre peu de similarités cliniques et lésionnelles. Les infections à AVM et NVM sont généralement asymptomatiques et persistent dans une colonie de façon silencieuse. Cependant, certaines souches de souris, notamment immunodéficientes, développent des signes cliniques lors d'infections par ces virus. Le NVM est capable d'induire une mort soudaine, une

distension abdominale ou encore des diarrhées sévères (Karst et al. 2003 ; Mumphrey et al. 2007). En revanche, L'AVM n'induit que des diarrhées chez la souris (Kjeldsberg et Hem, 1985).

A l'autopsie, l'AVM et le NVM n'engendrent pas de lésions macroscopiques intestinales bien que les deux virus aient été mis en évidence dans différents organes du tractus digestif. De plus, peu d'altérations microscopiques sont associées à ces virus alors que l'AVM colonise le tractus digestif et le NVM a un tropisme pour les cellules lymphoïdes intestinales (Gonzalez-Hernandez *et al.*, 2014). Une des femelles allaitantes atteintes d'ENA présentait des cellules en apoptose au niveau d'une plaque de Peyer, une infection à NVM pourrait en être la cause. La comparaison des futurs résultats de RT-qPCR de cette souris avec les données histologiques pourrait permettre de relier cette lésion au NVM.

Par ailleurs, il n'est pas exclu que l'interaction d'autres agents pathogènes ou la concomitance d'un déficit métabolique associé aux AVM et NVM soient à l'origine d'ENA. De plus, la présence de parasites intestinaux au sein d'une colonie de souris favorise la contamination par d'autres agents pathogènes. Or, nos souris étaient parfois infestées d'oxyures à l'autopsie.

Enfin, le fort potentiel de mutation des AVM aurait pu les rendre plus pathogènes.

□ Informations issues des données de qPCR

Grâce aux valeurs de Ct associées aux résultats de migration sur gel d'électrophorèse et de PCR, notre étude a permis de confirmer la présence d'AVM et de NVM chez quelques-uns de nos individus.

Parmi les six individus atteints d'ENA, quatre étaient positifs au NVM et un à l'AVM : R1, R2, R3 et R4 étaient positifs pour les amplicons noro 1 et R3 était également positif pour l'amplicon astro 2. Néanmoins, mis à part l'individu R1 dont la charge virale était importante, les autres échantillons avaient une faible charge virale pour les deux virus.

Parmi les six individus contrôles, quatre étaient positifs au NVM et deux étaient positifs à l'AVM : S1, S3, S5, S6 étaient positifs pour les amplicons noro 1 et S4, S5 pour l'amplicon astro 2. Encore une fois, les charges virales de ces échantillons étaient faibles.

Deux individus étaient positifs pour les deux virus : R3 et S5. Aucun échantillon n'était positif pour l'amplicon astro 3.

Conclusion

Pendant près de 3 ans, les souris allaitantes de notre colonie ont été affectées par une entérite nécrosante aiguë à l'origine d'une mort soudaine sans signe d'appel. Au total, près de 10% des souris allaitantes de l'animalerie sont mortes d'ENA. C'est pourquoi nous avons entamé une étude visant à caractériser cette affection décrite dans les animaleries de recherche biomédicale dans le monde sous plusieurs appellations. L'étude que nous avons menée, bien qu'incomplète, a permis de répondre à certaines interrogations, de vérifier plusieurs hypothèses évoquées dans la littérature et de proposer une appellation afin de mieux identifier cette affection au sein des animaleries de laboratoire.

La première partie de notre étude consistait à vérifier certains facteurs de risque proposés par certaines publications. Contrairement à ce qui a été avancé, une portée de taille importante et le premier rang de parité ne sont pas des facteurs de risque de l'ENA, à l'instar de l'âge de la femelle au moment de la mise-bas. Par ailleurs, l'ENA ne se transmet probablement pas par voie sexuelle. Cependant, l'occurrence de l'ENA chez la mère de la souris allaitante est un facteur de risque de l'ENA (OR = 171).

La seconde partie a permis de déterminer deux profils lésionnels selon l'avancée de l'ENA. Lorsqu'une souris était retrouvée morte ou devait être euthanasiée, le duodénum proximal présentait toujours le profil lésionnel le plus avancé et était associé à une désorganisation structurale, une perte de la conformation circulaire et une nécrose des couches internes à l'origine d'un magma basophile dans la lumière intestinale. Le duodénum distal et le jéjunum présentaient généralement un profil lésionnel intermédiaire avec conservation de la structure en couches mais exfoliation et raccourcissement des villosités de la muqueuse et la sous-muqueuse laissant ainsi des cellules éosinophiles en cours de nécrose flotter dans la lumière intestinale. D'autre part, aucune lésion attribuable à *C. perfringens* ou *C. piliforme* n'a été mise en évidence.

Enfin, la dernière partie n'a pas pu être menée à son terme pour diverses raisons et ne permet donc pas de conclure quant à notre hypothèse de départ. Dans un premier temps, certains problèmes techniques ont empêché la réalisation de qPCR interprétables. Dans un second temps, par manque de temps, la recherche de *C. piliforme* par PCR nichées n'a pas pu être réalisée. Bien qu'il nous soit impossible d'interpréter les quantités virales des qPCR réalisées, on peut néanmoins affirmer qu'au moins quatre individus morts d'ENA étaient positifs pour le NVM (R1 à 4) et un seul pour l'AVM (R3). Par ailleurs, les cultures de *C. Perfringens* à partir des échantillons d'individus morts d'ENA étaient toutes négatives même si ces résultats sont à interpréter avec prudence compte tenu des conditions de prélèvement peu optimales.

Afin de quantifier les AVM et NVM de chaque échantillon et confirmer notre hypothèse, une nouvelle recherche de l'échantillon calibrateur pour les amorces astro parmi les individus morts d'ENA est nécessaire. R3 ne permettait pas de réaliser une gamme de dilution compte tenu de sa faible charge virale. Une fois trouvé, les gammes de dilutions pourront être réalisées à partir de l'individu R1 pour les couples d'amorces noro 1 et 2 et pour l'échantillon découvert pour les couples d'amorces astro 2 et 3. En ce qui concerne *C. piliforme*, des PCR nichées devront être réalisées sur l'ensemble des échantillons afin d'exclure la maladie de Tyzzer et renforcer notre hypothèse virale. La première étape consistera à extraire le reste des ADN bactériens des prélèvements restants et la seconde de réaliser les PCR nichées.

Liste des références bibliographiques

- ARIAS, A., BAILEY, D., CHAUDHRY, Y., *et al.* (2012) Development of a reverse-genetics system for murine norovirus 3: long-term persistence occurs in the caecum and colon. *The Journal of General Virology* vol. 93, n° Pt 7, p. 1432-1441. [<https://doi.org/10.1099/vir.0.042176-0>]
- AWAD, M.M., BRYANT, A.E., STEVENS, D.L., *et al.* (1995) Virulence studies on chromosomal alpha-toxin and theta-toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of alpha-toxin in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. *Molecular Microbiology* vol. 15, n° 2, p. 191-202. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02234.x>]
- BALDRIDGE, M.T., NICE, T.J., MCCUNE, B.T., *et al.* (2015) Commensal microbes and interferon- λ determine persistence of enteric murine norovirus infection. *Science (New York, N.Y.)* vol. 347, n° 6219, p. 266-269. [<https://doi.org/10.1126/science.1258025>]
- BAMUNUSINGHE, D., NAGHASHFAR, Z., BUCKLER-WHITE, A., *et al.* (2016) Sequence Diversity, Intersubgroup Relationships, and Origins of the Mouse Leukemia Gammaretroviruses of Laboratory and Wild Mice. *Journal of Virology* vol. 90, n° 8, p. 4186-4198. [<https://doi.org/10.1128/JVI.03186-15>]
- BARRON, E.L., SOSNOVTSEV, S.V., BOK, K., *et al.* (2011) Diversity of Murine Norovirus Strains Isolated from Asymptomatic Mice of Different Genetic Backgrounds within a Single U.S. Research Institute. *PLoS ONE* vol. 6, n° 6, p. e21435. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021435>]
- BARTNICKI, E., CUNHA, J.B., KOLAWOLE, A.O., *et al.* (2017) Recent advances in understanding noroviruses. *F1000Research* vol. 6, p. 79. [<https://doi.org/10.12688/f1000research.10081.1>]
- BASIC, M., KEUBLER, L.M., BUETTNER, M., *et al.* (2014) Norovirus triggered microbiota-driven mucosal inflammation in interleukin 10-deficient mice. *Inflammatory Bowel Diseases* vol. 20, n° 3, p. 431-443. [<https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000441346.86827.ed>]
- BELLIOT, G., LAVERAN, H., MONROE, S.S. (1997) Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *Journal of Medical Virology* vol. 51, n° 2, p. 101-106. [[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199702\)51:2<101::AID-JMV3>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199702)51:2<101::AID-JMV3>3.0.CO;2-B)]
- BLOMSTRÖM, A.-L., WIDÉN, F., HAMMER, A.-S., *et al.* (2010) Detection of a Novel Astrovirus in Brain Tissue of Mink Suffering from Shaking Mink Syndrome by Use of Viral Metagenomics. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 48, n° 12, p. 4392-4396. [<https://doi.org/10.1128/JCM.01040-10>]
- BORREGO, F. (2013) The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system. *Blood* vol. 121, n° 11, p. 1951-1960. [<https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-435057>]
- BORRIELLO, S.P., CARMAN, R.J. (1983) Association of iota-like toxin and *Clostridium spiroforme* with both spontaneous and antibiotic-associated diarrhea and colitis in rabbits. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 17, n° 3, p. 414-418.
- BUXTON, D., MORGAN, K.T. (1976) Studies of lesions produced in the brains of colostrum deprived lambs by *Clostridium welchii* (*Cl. perfringens*) Type D toxin. *Journal of Comparative Pathology* vol. 86, n° 3, p. 435-447. [[https://doi.org/10.1016/0021-9975\(76\)90012-8](https://doi.org/10.1016/0021-9975(76)90012-8)]
- CASERTA, J.A., ROBERTSON, S.L., SAPUTO, J., *et al.* (2011) Development and Application of a Mouse Intestinal Loop Model To Study the *In Vivo* Action of *Clostridium perfringens* Enterotoxin. *Infection and Immunity* vol. 79, n° 8, p. 3020-3027. [<https://doi.org/10.1128/IAI.01342-10>]
- CHACHU, K.A., STRONG, D.W., LOBUE, A.D., *et al.* (2008) Antibody Is Critical for the Clearance of Murine Norovirus Infection. *Journal of Virology*. [<https://doi.org/10.1128/JVI.00141-08>]
- CLIFFORD, C.B., PRITCHETT-CORNING, K.R. (2012) Bacterial Infections of Laboratory Mice. In *The Laboratory Mouse*, 2nd edition, Amsterdam, Elsevier, p. 481-501. [<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382008-2.00020-9>]

- COMPTON, S.R., BOOTH, C.J., MACY, J.D. (2017) Murine Astrovirus Infection and Transmission in Neonatal CD1 Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* vol. 56, n° 4, p. 402-411.
- COOPER, K.K., SONGER, J.G., UZAL, F.A. (2013) Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* vol. 25, n° 3, p. 314-327. [https://doi.org/10.1177/1040638713483468]
- CORTEZ, V., SHARP, B., YAO, J., *et al.* (2019) Characterizing a Murine Model for Astrovirus Using Viral Isolates from Persistently Infected Immunocompromised Mice. *Journal of Virology* vol. 93, n° 13, p. e00223-19. [https://doi.org/10.1128/JVI.00223-19]
- CRAIG, J.P., MILES, A.A. (1961) Some properties of the iota-toxin of *Clostridium welchii*, including its action on capillary permeability. *The Journal of Pathology and Bacteriology* vol. 81, n° 2, p. 481-493. [https://doi.org/10.1002/path.1700810221]
- DAGNAES-HANSEN, F., MOSER, J.M., SMITH-JOHN, T., *et al.* (2010) Sudden death in lactating inbred mice. *Lab Animal* vol. 39, n° 7, p. 205-205. [https://doi.org/10.1038/labon0710-205]
- DENNEHY, P.H., NELSON, S.M., SPANGENBERGER, S., *et al.* (2001) A Prospective Case-Control Study of the Role of Astrovirus in Acute Diarrhea among Hospitalized Young Children. *The Journal of Infectious Diseases* vol. 184, n° 1, p. 10-15. [https://doi.org/10.1086/321007]
- DONATO, C., VIJAYKRISHNA, D. (2017) The Broad Host Range and Genetic Diversity of Mammalian and Avian Astroviruses. *Viruses* vol. 9, n° 5, p. 102. [https://doi.org/10.3390/v9050102]
- FEINSTEIN, R.E., MORRIS, W.E., WALDEMARSON, A.H., *et al.* (2008) Fatal Acute Intestinal Pseudoobstruction in Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* vol. 47, n° 3, p. 6.
- FERNANDEZ-MIYAKAWA, M.E., FISHER, D.J., POON, R., *et al.* (2007a) Both Epsilon-Toxin and Beta-Toxin Are Important for the Lethal Properties of *Clostridium perfringens* Type B Isolates in the Mouse Intravenous Injection Model. *Infection and Immunity* vol. 75, n° 3, p. 1443-1452. [https://doi.org/10.1128/IAI.01672-06]
- FERNANDEZ-MIYAKAWA, M.E., JOST, B.H., BILLINGTON, S.J., *et al.* (2008) Lethal effects of *Clostridium perfringens* epsilon toxin are potentiated by alpha and perfringolysin-O toxins in a mouse model. *Veterinary microbiology* vol. 127, n° 3-4, p. 379-385. [https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.09.013]
- FERNANDEZ-MIYAKAWA, M.E., SAYEED, S., FISHER, D.J., *et al.* (2007b) Development and Application of an Oral Challenge Mouse Model for Studying *Clostridium perfringens* Type D Infection. *Infection and Immunity* vol. 75, n° 9, p. 4282-4288. [https://doi.org/10.1128/IAI.00562-07]
- FINNIE, J.W. (1984) Ultrastructural changes in the brain of mice given *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *Journal of Comparative Pathology* vol. 94, n° 3, p. 445-452. [https://doi.org/10.1016/0021-9975(84)90031-8]
- FISHER, D.J., FERNANDEZ-MIYAKAWA, M.E., SAYEED, S., *et al.* (2006) Dissecting the Contributions of *Clostridium perfringens* Type C Toxins to Lethality in the Mouse Intravenous Injection Model. *Infection and Immunity* vol. 74, n° 9, p. 5200-5210. [https://doi.org/10.1128/IAI.00534-06]
- FRAY, M.D., PICKARD, A.R., HARRISON, M., *et al.* (2008) Upgrading mouse health and welfare: direct benefits of a large-scale rederivation programme. *Laboratory Animals* vol. 42, n° 2, p. 127-139. [https://doi.org/10.1258/la.2007.007005]
- FREEDMAN, J.C., NAVARRO, M.A., MORRELL, E., *et al.* (2018) Evidence that *Clostridium perfringens* Enterotoxin-Induced Intestinal Damage and Enterotoxemic Death in Mice Can Occur Independently of Intestinal Caspase-3 Activation. *Infection and Immunity* vol. 86, n° 7, p. e00931-17, /iai/86/7/e00931-17.atom. [https://doi.org/10.1128/IAI.00931-17]
- GARCIA, J.P., ADAMS, V., BEINGESSER, J., *et al.* (2013) Epsilon Toxin Is Essential for the Virulence of *Clostridium perfringens* Type D Infection in Sheep, Goats, and Mice. *Infection and Immunity* vol. 81, n° 7, p. 2405-2414. [https://doi.org/10.1128/IAI.00238-13]
- GIBERT, M., JOLIVET-RENAUD, C., POPOFF, M.R. (1997) Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* vol. 203, n° 1, p. 65-73. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00493-9]

- GILL, D.M. (1982) Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiological Reviews* vol. 46, n° 1, p. 86-94.
- GONZALEZ-HERNANDEZ, M.B., LIU, T., PAYNE, H.C., *et al.* (2014) Efficient Norovirus and Reovirus Replication in the Mouse Intestine Requires Microfold (M) Cells. *Journal of Virology* vol. 88, n° 12, p. 6934-6943. [<https://doi.org/10.1128/JVI.00204-14>]
- GOUGH, R.E., BORLAND, E.D., KEYMER, I.F., *et al.* (1985) An outbreak of duck hepatitis type ii in commercial ducks. *Avian Pathology* vol. 14, n° 2, p. 227-236. [<https://doi.org/10.1080/03079458508436224>]
- GRAHAM, D.Y., JIANG, X., TANAKA, T., *et al.* (1994) Norwalk Virus Infection of Volunteers: New Insights Based on Improved Assays. *Journal of Infectious Diseases* vol. 170, n° 1, p. 34-43. [<https://doi.org/10.1093/infdis/170.1.34>]
- GRAZIANO, V.R., ALFAJARO, M.M., SCHMITZ, C.O., *et al.* (2021) CD300lf Conditional Knockout Mouse Reveals Strain-Specific Cellular Tropism of Murine Norovirus. *Journal of Virology* vol. 95, n° 3, p. e01652-20. [<https://doi.org/10.1128/JVI.01652-20>]
- GROHMANN, G.S., GLASS, R.I., PEREIRA, H.G., *et al.* (1993) Enteric Viruses and Diarrhea in HIV-Infected Patients. *New England Journal of Medicine* vol. 329, n° 1, p. 14-20. [<https://doi.org/10.1056/NEJM199307013290103>]
- HAGA, K., FUJIMOTO, A., TAKAI-TODAKA, R., *et al.* (2016) Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld within the CD300 family enable murine noroviruses to infect cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 113, n° 41, p. E6248-E6255. [<https://doi.org/10.1073/pnas.1605575113>]
- HSU, C.C., RILEY, L.K., WILLS, H.M., *et al.* (2006) Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses. *Comparative Medicine* vol. 56, n° 4, p. 247-251.
- HSU, C.C., WOBUS, C.E., STEFFEN, E.K., *et al.* (2005) Development of a Microsphere-Based Serologic Multiplexed Fluorescent Immunoassay and a Reverse Transcriptase PCR Assay To Detect Murine Norovirus 1 Infection in Mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* vol. 12, n° 10, p. 1145-1151. [<https://doi.org/10.1128/CDLI.12.10.1145-1151.2005>]
- INGLE, H., LEE, S., AI, T., *et al.* (2019) Viral complementation of immunodeficiency confers protection against enteric pathogens via IFN-λ. *Nature microbiology* vol. 4, n° 7, p. 1120-1128. [<https://doi.org/10.1038/s41564-019-0416-7>]
- IWAI, H., HOBERMAN, A.M. (2014) Oral (Gavage) Combined Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Toxicity Study of Ammonium Salt of Perfluorinated Hexanoic Acid in Mice. *International Journal of Toxicology* vol. 33, n° 3, p. 219-237. [<https://doi.org/10.1177/1091581814529449>]
- JINDAL, N., MOR, S.K., GOYAL, S.M. (2014) Enteric viruses in turkey enteritis. *Virusdisease* vol. 25, n° 2, p. 173-185. [<https://doi.org/10.1007/s13337-014-0198-8>]
- JONES, M.K., WATANABE, M., ZHU, S., *et al.* (2014) Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* vol. 346, n° 6210, p. 755-759. [<https://doi.org/10.1126/science.1257147>]
- KARST, S.M., WOBUS, C.E., LAY, M., *et al.* (2003) STAT1-Dependent Innate Immunity to a Norwalk-Like Virus. *Science* vol. 299, n° 5612, p. 1575-1578. [<https://doi.org/10.1126/science.1077905>]
- KARST, S.M., ZHU, S., GOODFELLOW, I.G. (2015) The molecular pathology of noroviruses. *The Journal of Pathology* vol. 235, n° 2, p. 206-216. [<https://doi.org/10.1002/path.4463>]
- KASTENMAYER, R.J., PERDUE, K.A., ELKINS, W.R. (2008) Eradication of Murine Norovirus from a Mouse Barrier Facility. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* vol. 47, n° 1, p. 26-30.
- KATAHIRA, J., SUGIYAMA, H., INOUE, N., *et al.* (1997) Clostridium perfringens Enterotoxin Utilizes Two Structurally Related Membrane Proteins as Functional Receptors in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* vol. 272, n° 42, p. 26652-26658. [<https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26652>]
- KEYBURN, A.L., BOYCE, J.D., VAZ, P., *et al.* (2008) NetB, a New Toxin That Is Associated with Avian Necrotic Enteritis Caused by Clostridium perfringens. *PLoS Pathogens* vol. 4, n° 2, p. e26. [<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040026>]

- KIM, H., BANG, J., BAEK, S.H., *et al.* (2022) Eliminating murine norovirus, *Helicobacter hepaticus*, and intestinal protozoa by embryo transfer for an entire mouse barrier facility. *Experimental Animals* vol. 71, n° 1, p. 28-35. [<https://doi.org/10.1538/expanim.21-0026>]
- KJELDSBERG, E., HEM, A. (1985) Detection of astroviruses in gut contents of nude and normal mice. Brief report. *Archives of Virology* vol. 84, n° 1-2, p. 135-140. [<https://doi.org/10.1007/BF01310560>]
- KOLAWOLE, A.O., MIRABELLI, C., HILL, D.R., *et al.* (2019) Astrovirus replication in human intestinal enteroids reveals multi-cellular tropism and an intricate host innate immune landscape. *PLoS Pathogens* vol. 15, n° 10, p. e1008057. [<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008057>]
- KOO, H.L., AJAMI, N., ATMAR, R.L., *et al.* (2010) Noroviruses: The Principal Cause of Foodborne Disease Worldwide. *Discovery medicine* vol. 10, n° 50, p. 61-70.
- KOZAK, C.A. (2014) Origins of the Endogenous and Infectious Laboratory Mouse Gammaretroviruses. *Viruses* vol. 7, n° 1, p. 1-26. [<https://doi.org/10.3390/v7010001>]
- KRUGNER-HIGBY, L., GIRARD, I., WELTER, J., *et al.* (2006) Clostridial Enteropathy in Lactating Outbred Swiss-derived (ICR) Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* vol. 45, n° 6, p. 8.
- KUNSTÝŘ, I. (1986) Paresis of peristalsis and ileus lead to death in lactating mice. *Laboratory Animals* vol. 20, n° 1, p. 32-35. [<https://doi.org/10.1258/002367786781062043>]
- LEE, S., LIU, H., WILEN, C.B., *et al.* (2019) A secreted viral non-structural protein determines intestinal norovirus pathogenesis. *Cell Host & Microbe* vol. 25, n° 6, p. 845- 857.e5. [<https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.04.005>]
- LEE, S.-G., LEE, S.-H., PARK, S.-W., *et al.* (2011) Standardized positive controls for detection of norovirus by reverse transcription PCR. *Virology Journal* vol. 8, n° 1, p. 260. [<https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-260>]
- LEI, S., RYU, J., WEN, K., *et al.* (2016) Increased and prolonged human norovirus infection in RAG2/IL2RG deficient gnotobiotic pigs with severe combined immunodeficiency. *Scientific Reports* vol. 6, n° 1, p. 25222. [<https://doi.org/10.1038/srep25222>]
- LEWIS, T.L., GREENBERG, H.B., HERRMANN, J.E., *et al.* (1994) Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA-dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein. *Journal of Virology* vol. 68, n° 1, p. 77-83. [<https://doi.org/10.1128/jvi.68.1.77-83.1994>]
- LIU, B.L., LAMBDEN, P.R., GÜNTHER, H., *et al.* (1999) Molecular Characterization of a Bovine Enteric Calicivirus: Relationship to the Norwalk-Like Viruses. *Journal of Virology* vol. 73, n° 1, p. 819-825.
- LIVINGSTON, R.S., FRANKLIN, C.L., BESCH-WILLIFORD, C.L., *et al.* (1996) A novel presentation of Clostridium piliforme infection (Tyzzer's disease) in nude mice. *Laboratory Animal Science* vol. 46, n° 1, p. 21-25.
- LOPMAN, B.A., STEELE, D., KIRKWOOD, C.D., *et al.* (2016) The Vast and Varied Global Burden of Norovirus: Prospects for Prevention and Control. *PLoS Medicine* vol. 13, n° 4, p. e1001999. [<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001999>]
- MADELEY, C.R., COSGROVE, B.P. (1975) 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *The Lancet* vol. 306, n° 7932, p. 451-452. [[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(75\)90858-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(75)90858-2)]
- MANDER, K.A., UZAL, F.A., WILLIAMS, R., *et al.* (2020) Clostridium perfringens type D epsilon toxin produces a rapid and dose-dependent cytotoxic effect on cerebral microvascular endothelial cells in vitro. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* vol. 32, n° 2, p. 277-281. [<https://doi.org/10.1177/1040638719882745>]
- MANICH, M., KNAPP, O., GIBERT, M., *et al.* (2008) Clostridium perfringens Delta Toxin Is Sequence Related to Beta Toxin, NetB, and Staphylococcus Pore-Forming Toxins, but Shows Functional Differences. *PLoS ONE* vol. 3, n° 11, p. e3764. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003764>]
- MATSUSHITA, S., MATSUMOTO, T. (1986) Spontaneous necrotic enteritis in young RFM/Ms mice. *Laboratory Animals* vol. 20, n° 2, p. 114-117. [<https://doi.org/10.1258/002367786780865124>]

- MCFADDEN, N., BAILEY, D., CARRARA, G., *et al.* (2011) Norovirus Regulation of the Innate Immune Response and Apoptosis Occurs via the Product of the Alternative Open Reading Frame 4. *PLoS Pathogens* vol. 7, n° 12, p. e1002413. [https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002413]
- MEHDIZADEH GOHARI, I., A. NAVARRO, M., LI, J., *et al.* (2021) Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence* vol. 12, n° 1, p. 723-753. [https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1886777]
- MÉNDEZ, E., FERNÁNDEZ-LUNA, T., LÓPEZ, S., *et al.* (2002) Proteolytic Processing of a Serotype 8 Human Astrovirus ORF2 Polyprotein. *Journal of Virology* vol. 76, n° 16, p. 7996-8002. [https://doi.org/10.1128/JVI.76.16.7996-8002.2002]
- MORITA, H., YASUDA, M., YAMAMOTO, M., *et al.* (2020) Prevalence of murine astrovirus in laboratory animal facilities in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* vol. 82, n° 7, p. 881-885. [https://doi.org/10.1292/jvms.20-0180]
- MOSER, L.A., CARTER, M., SCHULTZ-CHERRY, S. (2007) Astrovirus Increases Epithelial Barrier Permeability Independently of Viral Replication. *Journal of Virology* vol. 81, n° 21, p. 11937-11945. [https://doi.org/10.1128/JVI.00942-07]
- MUMPHREY, S.M., CHANGOTRA, H., MOORE, T.N., *et al.* (2007) Murine Norovirus 1 Infection Is Associated with Histopathological Changes in Immunocompetent Hosts, but Clinical Disease Is Prevented by STAT1-Dependent Interferon Responses. *Journal of Virology* vol. 81, n° 7, p. 3251-3263. [https://doi.org/10.1128/JVI.02096-06]
- NACCACHE, S.N., PEGGS, K.S., MATTES, F.M., *et al.* (2015) Diagnosis of Neuroinvasive Astrovirus Infection in an Immunocompromised Adult With Encephalitis by Unbiased Next-Generation Sequencing. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* vol. 60, n° 6, p. 919-923. [https://doi.org/10.1093/cid/ciu912]
- NAGAHAMA, M., HAYASHI, S., MORIMITSU, S., *et al.* (2003) Biological Activities and Pore Formation of *Clostridium perfringens* Beta Toxin in HL 60 Cells. *Journal of Biological Chemistry* vol. 278, n° 38, p. 36934-36941. [https://doi.org/10.1074/jbc.M306562200]
- NAVARRO, M.A., LI, J., MCCLANE, B.A., *et al.* (2018) NanI Sialidase Is an Important Contributor to *Clostridium perfringens* Type F Strain F4969 Intestinal Colonization in Mice. *Infection and Immunity* vol. 86, n° 12, p. e00462-18, /iai/86/12/e00462-18.atom. [https://doi.org/10.1128/IAI.00462-18]
- NICE, T.J., BALDRIDGE, M.T., MCCUNE, B.T., *et al.* (2015) Interferon λ cures persistent murine norovirus infection in the absence of adaptive immunity. *Science (New York, N.Y.)* vol. 347, n° 6219, p. 269-273. [https://doi.org/10.1126/science.1258100]
- NIEPCERON, A. (2007) Mise au point d'une technique dite de « nested PCR » (PCR nichée) pour la détection de *Clostridium piliforme*, agent de la maladie de Tyzzer. In *12èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans*.
- NORMAND, B.L., LICOIS, D., NIEPCERON, A., *et al.* (2005) Description d'un cas de maladie de Tyzzer en élevage intensif de lapins de chair. In *11èmes Journées de la Recherche Cunicole, Paris*.
- ORCHARD, R.C., WILEN, C.B., DOENCH, J.G., *et al.* (2016) Discovery of a proteinaceous cellular receptor for a norovirus. *Science (New York, N.Y.)* vol. 353, n° 6302, p. 933-936. [https://doi.org/10.1126/science.aaf1220]
- PAIK, J., FIERCE, Y., MAI, P.-O., *et al.* (2011) Murine Norovirus Increases Atherosclerotic Lesion Size and Macrophages in *Ldlr*^{-/-} Mice. *Comparative Medicine* vol. 61, n° 4, p. 330-338.
- PÉROT, P., LECUIT, M., ELOIT, M. (2017) Astrovirus Diagnostics. *Viruses* vol. 9, n° 1, p. 10. [https://doi.org/10.3390/v9010010]
- PETRILLO, T.M., BECK-SAGUÉ, C.M., SONGER, J.G., *et al.* (2000) Enteritis Necroticans (Pigbel) in a Diabetic Child. *New England Journal of Medicine* vol. 342, n° 17, p. 1250-1253. [https://doi.org/10.1056/NEJM200004273421704]
- PFEIFFER, J.K., VIRGIN, H.W. (2016) Transkingdom control of viral infection and immunity in the mammalian intestine. *Science (New York, N.Y.)* vol. 351, n° 6270, p. 10.1126/science.aad5872 aad5872. [https://doi.org/10.1126/science.aad5872]
- PHAN, T.G., KAPUSINSZKY, B., WANG, C., *et al.* (2011) The Fecal Viral Flora of Wild Rodents. *PLoS Pathogens* vol. 7, n° 9, p. e1002218. [https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002218]

- REDONDO, L.M., REDONDO, E.A., DAILOFF, G.C., *et al.* (2017) Effects of Clostridium perfringens iota toxin in the small intestine of mice. *Anaerobe* vol. 48, p. 83-88. [https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.07.007]
- REUTER, G., PANKOVICS, P., BOROS, A. (2011) Identification of a novel astrovirus in a domestic pig in Hungary. *Archives of Virology* vol. 156, n° 1, p. 125-128. [https://doi.org/10.1007/s00705-010-0827-5]
- RODRIGUES, D.M., MOREIRA, J.C. de O., LANCELLOTTI, M., *et al.* (2017) Murine norovirus infection in Brazilian animal facilities. *Experimental Animals* vol. 66, n° 2, p. 115-124. [https://doi.org/10.1538/expanim.16-0027]
- ROOD, J.I., ADAMS, V., LACEY, J., *et al.* (2018) Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme. *Anaerobe* vol. 53, p. 5-10. [https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011]
- ROTH, A.N., HELM, E.W., MIRABELLI, C., *et al.* (2020) Norovirus infection causes acute self-resolving diarrhea in wild-type neonatal mice. *Nature Communications* vol. 11, n° 1, p. 2968. [https://doi.org/10.1038/s41467-020-16798-1]
- ROZENGURT, N., SANCHEZ, S. (1999) Duodenal Adenomas in Balb/-c Mice Monoinfected with Clostridium perfringens. *Journal of Comparative Pathology* vol. 121, n° 3, p. 217-225. [https://doi.org/10.1053/jcpa.1999.0319]
- SAYEED, S., FERNANDEZ-MIYAKAWA, M.E., FISHER, D.J., *et al.* (2005) Epsilon-Toxin Is Required for Most Clostridium perfringens Type D Vegetative Culture Supernatants To Cause Lethality in the Mouse Intravenous Injection Model. *Infection and Immunity* vol. 73, n° 11, p. 7413-7421. [https://doi.org/10.1128/IAI.73.11.7413-7421.2005]
- SAYEED, S., UZAL, F.A., FISHER, D.J., *et al.* (2008) Beta toxin is essential for the intestinal virulence of Clostridium perfringens type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. *Molecular Microbiology* vol. 67, n° 1, p. 15-30. [https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06007.x]
- SCHMIDT, K., BUTT, J., MAUTER, P., *et al.* (2017) Development of a multiplex serological assay reveals a worldwide distribution of murine astrovirus infections in laboratory mice. *PLoS ONE* vol. 12, n° 10, p. e0187174. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187174]
- SEIKE, S., TAKEHARA, M., KOBAYASHI, K., *et al.* (2019) Clostridium perfringens Delta-Toxin Damages the Mouse Small Intestine. *Toxins* vol. 11, n° 4, p. 232. [https://doi.org/10.3390/toxins11040232]
- SONGER, J.G. (1996) Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 9, n° 2, p. 216-234.
- SONGER, J.G., MISKIMMINS, D.W. (2004) Clostridium perfringens type E enteritis in calves: two cases and a brief review of the literature. *Anaerobe* vol. 10, n° 4, p. 239-242. [https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2004.05.001]
- STEINTHORSOTTIR, V., HALLDÓRSSON, H., ANDRÉSSON, Oâ.S. (2000) Clostridium perfringens beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. *Microbial Pathogenesis* vol. 28, n° 1, p. 45-50. [https://doi.org/10.1006/mpat.1999.0323]
- STILES, B.G., WILKINS, T.D. (1986) Clostridium perfringens iota toxin: Synergism between two proteins. *Toxicon* vol. 24, n° 8, p. 767-773. [https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90101-7]
- UZAL, F.A., KELLY, W.R. (1996) Enterotoxaemia in goats. *Veterinary Research Communications* vol. 20, n° 6, p. 481-492. [https://doi.org/10.1007/BF00396291]
- UZAL, F.A., MCCLANE, B.A. (2011) Recent progress in understanding the pathogenesis of Clostridium perfringens type C infections. *Veterinary Microbiology* vol. 153, n° 1-2, p. 37-43. [https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.048]
- UZAL, F.A., SAPUTO, J., SAYEED, S., *et al.* (2009a) Development and Application of New Mouse Models To Study the Pathogenesis of Clostridium perfringens Type C Enterotoxemias. *Infection and Immunity* vol. 77, n° 12, p. 5291-5299. [https://doi.org/10.1128/IAI.00825-09]
- UZAL, F.A., SAPUTO, J., SAYEED, S., *et al.* (2009b) Development and Application of New Mouse Models To Study the Pathogenesis of Clostridium perfringens Type C Enterotoxemias. *Infection and Immunity* vol. 77, n° 12, p. 5291-5299. [https://doi.org/10.1128/IAI.00825-09]

- UZAL, F.A., SONGER, J.G. (2008) Diagnosis of Clostridium Perfringens Intestinal Infections in Sheep and Goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* vol. 20, n° 3, p. 253-265. [https://doi.org/10.1177/104063870802000301]
- UZAL, F.A., SONGER, J.G., PRESCOTT, J.F. (2016) Clostridial Diseases of Animals. *In Clostridial Diseases of Animals*. Hoboken, Wiley Blackwell, p. 357.
- UZAL, F.A., VIDAL, J.E., MCCLANE, B.A., *et al.* (2010) Clostridium Perfringens Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. *The open toxinology journal* vol. 2, p. 24-42.
- VALENZUELA, C. (1993) Two solutions for estimating odds ratios with zeros. *Revista Medica De Chile* vol. 121, n° 12, p. 1441-1444.
- VON MOLTKE, J., JI, M., LIANG, H.-E., *et al.* (2016) Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. *Nature* vol. 529, n° 7585, p. 221-225. [https://doi.org/10.1038/nature16161]
- WANG, L., SHEN, H., ZHENG, Y., *et al.* (2020) Astrovirus in White-Tailed Deer, United States, 2018. *Emerging Infectious Diseases* vol. 26, n° 2, p. 374-376. [https://doi.org/10.3201/eid2602.190878]
- WANG, Q.-H., HAN, M.G., CHEETHAM, S., *et al.* (2005) Porcine Noroviruses Related to Human Noroviruses. *Emerging Infectious Diseases* vol. 11, n° 12, p. 1874-1881. [https://doi.org/10.3201/eid1112.050485]
- WHARY, M.T., BAUMGARTH, N., FOX, J.G., *et al.* (2015) Biology and Diseases of Mice. *In Laboratory Animal Medicine*, 3rd edition, Amsterdam, Elsevier, p. 43-149. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00003-1]
- WILEN, C.B., LEE, S., HSIEH, L.-Y., *et al.* (2018) Tropism for tuft cells determines immune promotion of norovirus pathogenesis. *Science (New York, N.Y.)* vol. 360, n° 6385, p. 204-208. [https://doi.org/10.1126/science.aar3799]
- WOBUS, C.E., KARST, S.M., THACKRAY, L.B., *et al.* (2004) Replication of Norovirus in Cell Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophages. *PLoS Biology* vol. 2, n° 12, p. e432. [https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020432]
- YOKOYAMA, C.C., LOH, J., ZHAO, G., *et al.* (2012) Adaptive Immunity Restricts Replication of Novel Murine Astroviruses. *Journal of Virology* vol. 86, n° 22, p. 12262-12270. [https://doi.org/10.1128/JVI.02018-12]
- ZHU, A.L., ZHAO, W., YIN, H., *et al.* (2011) Isolation and characterization of canine astrovirus in China. *Archives of Virology* vol. 156, n° 9, p. 1671-1675. [https://doi.org/10.1007/s00705-011-1022-z]
- ZHU, S., JONES, M.K., HICKMAN, D., *et al.* (2016) Norovirus Antagonism of B cell Antigen Presentation Results in Impaired Control of Acute Infection. *Mucosal Immunology* vol. 9, n° 6, p. 1559-1570. [https://doi.org/10.1038/mi.2016.15]

Annexe 1 : Exemple d'un fichier de génotypage

Mère: F11-513-576 bKO/+		Date de Naissance:		Ptpla 302			
Père: F11-58-613 bKO/+		14/01/2016					
Identification	N° Photos	bKO ptpla	Génotype	Sexe	N° Big Bench	Eutha	Observation
ODC	1		bKO/+	F	F12-576-736		
OGC	2		bKO/bKO	F			
20C	3		+/+	F			
CLOD	4		bKO/+	F			
ODC	5		+/+	M			
OGC	6		bKO/+	M			
20C	7		+/+	M	F12-576-742		

Mère: F5-86-132 bKO/+		Date de Naissance:		Ptplb A10 bKO			
Père: B6 M74		18/01/2016					
Identification	N° Photos	bKO ptpla	Génotype	Sexe	N° Big Bench	Eutha	Observation
ODC	8		bKO/+	F	F6-132-157		
OGC	9		bKO/+	F			
20C	10		+/+	F			
CLOD	11		+/+	F			
CLOG	12		bKO/+	F			
2CLO	13		+/+	F			
ODC CLOG	14		+/+	F			
OGC CLOD	15		bKO/+	F			
ODC	16		bKO/+	M	F6-132-165		

Mère: F5-54-79 Flox/+		Date de Naissance:		Ptplb A10 Flox			
Père: B6 M67		21/01/2016					
Identification	N° Photos	bKO ptpla	Génotype	Sexe	N° Big Bench	Eutha	Observation
ODC	17		+/+	F	F9-79-130		
ODC	18		Flox/+	M	F9-79-131		

Mère: AccB		Date de Naissance:		Ptpla 302			
Père:		23/12/2015					
Identification	N° Photos	bKO ptpla	Génotype	Sexe	N° Big Bench	Eutha	Observation
136	19		bKO/bKO	M			

Annexe 2 : Feuille de suivi quotidien

Feuille de suivi quotidien de l'animalerie



Date :

Page /

Transfert en maternité

Salle d'origine	Lignée et numéro de la femelle	Numéro du mâle	Date accouplement	Transfert par

Sevrages dans l'animalerie

Salle d'origine	Lignée et numéro de la femelle	Nombre de mâles	Nombre de femelles	Génotypage	
				fait -> transfert	à faire

Evénements dans l'animalerie

Salle d'origine	Lignée et numéro de la femelle	Mise-bas et # de petits comptés	Cannibalisme, nbre de morts	Retour élevage	Femelle morte

Remarques particulières toutes salles (température, hygrométrie, fonctionnement, alimentation...)

T° en 14 : °C
 T° en 15 : °C
 T° en 17 : °C
 T° en 19 : °C

Visas (signatures)

Annexe 3 : Aperçu du cahier d'élevage

Date	Taille de la portée	Lignée	Femelle et mâle d'accouplement
13/08/17	10	Hacd1-bko-99-bko	♀ F10-136-923
15/08/17	9	Hacd1 bko 302xbko	♂ F10-809-921 ♀ F14-966-1058
26/08/17	8	PKC Ce	♂ F13-858-1066 ♀ F6-34-51
27/08/17	8	Hacd1-bko-302	♂ B6-1199 ♀ B6-189
2/09/17	9	Hacd2-Ato-Flox	♂ F13-889-1036 ♀ F9-226-260
12/09/17	8	Hacd1 bko 99	♂ BG-1193 ♀ F10-809-916
10/09/17	9	Hacd2 Ato-cko	♂ BG-1195 ♀ BG-F172
13/09/17	8	Hacd1-302-bkoxbko	♂ F7-138-149 ♀ F13-858-1035
16/09/17	6	"	♂ F13-858-1067 ♀ F14-966-1057
22/09/17	8	Hacd1-bko-302	♂ F13-858-1066 ♀ B6-
1/10/17	7	"	♂ F13-889-1036 ♀ BG-F167
23/10/17	6	Hacd1 cko 99 x HSA creeri 2	♂ F13-889-1036+/- ♀ F11-966-996 ♂ F1-1620-7
26/10/17	8	"	♀ F2-3-9
23/10/17	10	"	♂ F11-192-1023 ♀ F11-966-999
"	6	"	♂ F1-1620-8 ♀ F2-4-19
8/11/17	8	MT mG	♂ F11-191-1020 ♀ F1-1-1
31/10/17	7	Hacd1-cko-99 x bko + HSA-Ce Grt2	♂ F1-1-4 ♀ F11-910-47 ♂ F11-910-48
1/11/17	11	Cko Ce Grt2 x mTmG	♀ F1-500-783-5 ♂ F1-1-4
25/10/17	8	Hacd1-cko-99 x HSA Ce Grt2	♀ F11-933-1005 ♂ F1-1620-8
28/10/17	7	"	♀ F2-4-17 ♂ F11-191-1020
31/10/17	5	Hacd1-cko-99 + HSA Ce Grt2 + bko	♀ F11-915-7 x ♂ F11-914-8/9 ou/10
5/11/17	9	Hacd1-cko-99	♀ B6-191 x ♂ F11-933-1006
10/11/17	10	Hacd1-cko-99 x HSA Ce Grt2	♀ F11-966-997 ♂ F1-1620-7
16/11/17	5	CS7 L6/M	♀ F173 ♂ F178
"	6	Hacd2-609-Flox	♀ B6-F169 ♂ F6-189-248

Annexe 4 : Feuille d'autopsie

Feuille d'autopsie



Id souris :

Date du décès :

Observations :

Prélèvements pour analyse : Oui Non

Id souris :

Date du décès :

Observations :

Prélèvements pour analyse : Oui Non

Id souris :

Date du décès :

Observations :

Prélèvements pour analyse : Oui Non

Visas (signatures)

Annexe 5 : Caractéristiques des individus contrôles

Individus	Date de décès ou euthanasie	Conditions de prélèvement	Prélèvements	Stockage et Utilisation
S1 : F14-329-379 Née le 06/04/19 Trois petits nés le 15/07/19	24/07/19	Euthanasie et prélèvement immédiat	Duodénum proximal Jéjunum moyen	- 80 °C
S2 : F14-329-378 Née le 06/04/19 Huit petits nés le 16/07/19	25/07/19	Euthanasie et prélèvement immédiat	Duodénum proximal Jéjunum moyen	- 80 °C
S3 : F19-56-83 N°6 Née le 09/05/19	19/07/19	Euthanasie et prélèvement immédiat	Duodénum proximal Jéjunum moyen	- 80 °C
S4 : F13-9-89 N°2 Née le 12/12/2018	19/07/19	Euthanasie et prélèvement immédiat Sevrage des petits le 18/07/19	Duodénum proximal Jéjunum moyen	- 80 °C
S5 : F11-215-244 Née le 28/03/19	21/07/19	Prélèvement après 24h à 4 °C	Duodénum proximal Jéjunum moyen	- 80 °C
S6 : F15-1294-29 Née le 26/01/19 Trois bébés nés le 27/08/19	05/09/19	Euthanasie et prélèvement immédiat	Duodénum proximal Jéjunum moyen	- 80 °C
F19-56-82 N°5 Née le 09/05/19	19/07/19	Euthanasie et congélation immédiate	Duodénum proximal Jéjunum moyen	- 80 °C
F19-59-88 N°6 Née le 10/05/19	19/07/19	Euthanasie et congélation immédiate	Duodénum proximal Jéjunum moyen	- 80 °C
F16-1210-26 N°2 Née le 07/12/2018	19/07/19	Euthanasie et congélation immédiate Sevrage des petits le 18/07/19	Duodénum proximal Jéjunum moyen	- 80 °C
F13-1145-69 N°4 Née le 13/12/2018	19/07/19	Euthanasie et congélation immédiate Sevrage des petits le 18/07/19	Duodénum proximal Jéjunum moyen	- 80 °C

F13-1112-1234 Née le 20/08/2018	19/07/19	Euthanasie et congélation immédiate	Duodénum proximal Jéjunum moyen	- 80 °C
F13-1133-1211 Née le 15/08/2018	19/07/19	Euthanasie et congélation immédiate	Duodénum proximal Jéjunum moyen	- 80 °C
F16-1157-1272 Née le 16/08/2018	19/07/19	Euthanasie et congélation immédiate	Duodénum proximal Jéjunum moyen	- 80 °C
F17-1232-1331 Née le 20/09/2018	19/07/19	Euthanasie et congélation immédiate	Duodénum proximal Jéjunum moyen	- 80 °C
F15-351-412 Née le 11/07/19 Sept bébés nés le 03/11/19 Quatre bébés le 02/12/19	05/12/19	Euthanasie juste avant prélèvement Lavage PBS puis injection formol	Duodénum proximal Jéjunum moyen Jéjunum distal	- 80 °C / Histologie
F15-364-463 Née le 20/06/19 Six bébés nés le 15/11/19	05/12/19	Euthanasie juste avant prélèvement Lavage PBS puis injection formol	Duodénum proximal Jéjunum moyen Jéjunum distal	- 80 °C / Histologie

Annexe 6 : Caractéristiques des individus atteints d'entérite nécrosante aiguë

Individus	Date de décès ou euthanasie	Conditions de prélèvements	Prélèvements	Stockage et Utilisation
R1 : souriceau Hacd1 N°1 Né le 15/06/17 et adopté le 26/06/17 Mère morte d'ENA	13/07/17	Cadavre frais	Intestin grêle moyen	- 80 °C
R2 : Femelle 3033	18/09/17	Euthanasiée	Intestin grêle proximal Intestin grêle moyen Intestin grêle distal	- 80 °C
R3 : F167 Née le 24/01/17 Sept petits nés le 01/10/17 Quatre petits adoptés le 04/10/17	08/10/17	Euthanasiée Lésion du tiers proximal de l'intestin	Intestin grêle proximal Intestin grêle moyen Intestin grêle distal	- 80 °C / Histologie
R4 : F204 Née le 26/05/17 Sept petits nés le 30/01/18	12/02/18	Euthanasiée Prostration marquée Traces de diarrhée dans la cage	Intestin grêle proximal Intestin grêle moyen Intestin grêle distal	- 80 °C / Histologie
R5 : F25 pièce 18 Née le 25/06/17 Pièce distincte de nos lignées Portoir ventilé	18/02/18	Euthanasiée suite à des manifestations de douleur	Intestin grêle proximal Intestin grêle moyen Intestin grêle distal	- 80 °C
R6 : Femelle IPO 18	24/08/18		Intestin grêle moyen	- 80 °C
F9-422-274 Mâle né le 15/01/18	04/07/18	Lésions sévères de l'intestin grêle	Intestin grêle proximal Intestin grêle distal	- 80 °C
Souriceau IPO 93 Né le 15/11/18, portoir ventilé	10/12/18	Cadavre retrouvé	Intestin grêle proximal Intestin grêle distal	- 80 °C

Souriceau IPO 94 Né le 15/11/18 Sur portoir ventilé	10/12/18	Cadavre retrouvé	Intestin grêle proximal Intestin grêle distal	- 80 °C
Souriceau IPO 96 Né le 15/11/18 Sur portoir ventilé	10/12/18	Cadavre retrouvé	Intestin grêle proximal Intestin grêle distal	- 80 °C
Souriceau F14-75 Né le 16/06/19	10/07/19	Cadavre retrouvé Lésions de l'intestin grêle	Intestin grêle proximal Intestin grêle distal	- 80 °C
Mâle F14-151-185	27/04/19	Euthanasié Lésions de l'intestin grêle	Intestin grêle moyen Intestin grêle distal	- 80 °C
Souriceau 2977 Né le 15/02/18 Portée entière morte	12/03/18	Cadavre frais Lésion sévère jusqu'à l'intestin grêle distal Atrophie rate et thymus	Intestin grêle proximal Intestin grêle moyen Intestin grêle distal	- 80 °C / Histologie
Femelle mTmG Née le 05/08/2018	31/08/18	Cadavre en bon état Lésions sur l'intestin grêle	Intestin grêle moyen Intestin grêle distal	- 80 °C
F14-336-382 Née le 17/05/19	15/11/19	Cadavre frais, rigide Dilatation du tube digestif	Intestin grêle proximal Intestin grêle moyen	- 80 °C / Histologie
F18-69-90 Née le 12/05/19	27/11/19	Euthanasiée Duodénum proximal lysé au tiers	Intestin grêle proximal Intestin grêle moyen	- 80 °C / Histologie
F18-49-128 Née le 20/06/19 Sept bébés nés le 21/11/19	05/12/19	Euthanasie juste avant prélèvement Lavage PBS puis injection formol Début ENA : inactivité, dos voussée, anus souillé Mais absence de nécrose macroscopique de l'intestin	Duodénum proximal Jéjunum moyen Jéjunum distal	- 80 °C / Histologie
F1-11-17 Née le 11/06/18	ND	Cadavre très frais	Intestin grêle moyen	- 80 °C
Femelle pdgf	ND		Intestin grêle moyen	- 80 °C

Annexe 7 : Base de données épidémiologiques

Cette base regroupe l'ensemble des portées obtenues entre janvier 2016 et novembre 2019. Chaque femelle peut donc être présente plusieurs fois en fonction de sa parité à chaque portée.

Abréviations des termes utilisés dans la base de données :

ENA : entérite nécrosante aiguë

Euth. : euthanasie pour ENA

GM : grand-mère

GP : grand-père

ID : identification

DDN : date de naissance

DDM : date de mort

MB : mise-bas

MPE : mort de la portée entière

MTP : mort de toute la portée

ND : non déterminé

RG : rang de gestation

Lignée femelle	ID mère	DDN femelle	RG	ENA	Euth.	DDM si ENA	MPE si ENA	DDN souriceaux	Taille portée	Lignée male	ID père	ID GM	ID GP	GM morte d'ENA	ENA après adoption	Si adoption ID femelle de provenance	Date adoption	Remarques / cannibalisme
Hacd1 302 bKO	F12-78-865	06/05/16	1	0				03/11/16	8	Hacd1 302 bKO	F12-77-894	F78	F11-58-613					
Hacd1 302 bKO	F12-77-888	17/05/16	1	0				03/11/16	9	Hacd1 302 bKO	F12-78-871	F77	F11-58-613					
Hacd1 302 bKO	F12-78-862	06/05/16	2	0				11/11/16	11	Hacd1 302 bKO	F12-77-894	F78	F11-58-613					MB 18/08/16
Hacd1 302 bKO	F12-77-889	17/05/16	1	0				13/11/16	9	Hacd1 302 bKO	F12-77895	F77	F11-58-613					
Hacd1 302 bKO	F12-616-858	06/05/16	1	0				16/11/16	10	Hacd1 302 bKO	F12-77-895	F11-56-616	M4					
Hacd2 A10 bKO	F6-175-278	24/07/16	1	1	0	03/03/2017	0	29/01/17	10	B6	M140	F5-5-175	M88	ND	0			7 souriceaux morts plus que 3 au génotypage
PGK Cre	F5-99-34	13/04/16	1	0				08/12/16	8	B6	M134	F99	F4-15-31					
HSA Cre ERT2	F1605	26/06/16	1?	0				10/12/16	6	Hacd1 99 cKO	F9-755-822	ND	ND					
Hacd1 302 bKO	F11-616-720	27/01/16	2	0				11/12/16	4	B6	M145	F11-56-616	M86					MB 10/05/16
Hacd1 A10 bKO Mesp Cre	F7-204-295	18/08/16	ND	0				11/12/16	8	Hacd2 A10 cKO	F6-65-129	ND	ND					
Hacd2 A10 cKO	F6-70-132	06/07/16	1	0				12/12/16	3	Hacd2 A10 bKO Mesp1 Cre	F7-204-291	F5-61-70	M94					
Hacd2 A10 cKO	F6-65-128	27/05/16	1	0				13/12/16	10	Hacd2 A10 bKO Mesp1 Cre	F7-205-307	F65	F5-63-105					
HSA Cre ERT2	F1619	01/07/16	1	0				13/12/16	7	Hacd1 99 cKO	F9-755-825	ND	ND					
HSA Cre ERT2	F1620	01/07/16	1?	0				13/12/16	8	Hacd1 99 cKO	F9-755-825	ND	ND					
Hacd1 99 cKO	F9-119-839	18/08/16	ND	0				14/12/16	6	HSA Cre ERT2	M1602	ND	ND					
Hacd2 G09 bKO Mesp1 Cre	F7-32-78	23/08/16	ND	0				14/12/16	9	Hacd2 A10 cKO Flp	F1-98-4	ND	ND					
Hacd2 A10 cKO	F6-71-122	06/05/16	1	0				16/12/16	3	Hacd2 A10 bKO Mesp1 Cre	F7-204-291	F5-61-71	M68					
B6	F99	29/01/16	2	0				23/12/16	1	Cx40 ERT2	M500783	F78	M53					MB 13/04/16
Hacd2 A10 bKO	F6-136-116	02/04/16	1	0				25/12/16	7	Hacd1 Swiss	F14-775-847	F5-86-136	F4-15-65					
Hacd2 A10 bKO	F6-145-259	04/05/16	1	0				26/12/16	9	Hacd1 Swiss	F14-761-881	F5-102-145	M83					
HSA Cre ERT2	F1606	26/06/16	1?	0				27/12/16	6	Hacd1 99 cKO	F9-755-822	ND	ND					
Hacd2 G09 cKO Flp	F9-96-13	22/07/16	ND	0				31/12/16	9	Mesp1 Cre	F7-33-95	ND	ND					
Hacd1 99 bKO	F9-678-808	11/07/16	1	0				04/01/17	4	Hacd1 99 bKO	F9-678-812	F8-496-678	M85					
Hacd1 99 cKO	F9-116-855	09/06/16	1	0				06/01/17	6	B6	M145	F116	F8-638-759					
Hacd1 302 bKO	F12-77-889	17/05/16	2	0				07/01/17	9	B6	M134	F77	F11-58-613					
B6	F136	20/07/16	2	0				07/01/17	5	Hacd1 99 bKO	F9-669-830	F99	M80					Cannibalisme le 231116
Hacd1 302 bKO	F13-887-963	11/11/16	1	1		23/03/2017		13/03/17	3	Hacd1 302 bKO	F12-717-971	F12-77-887	F12-78-871	0	ND			Souriceaux de 2 semaines environ
Hacd1 302 bKO	F13-858-999	16/11/16	1	1	0	23/03/2017	0	09/03/17	8	Hacd1 302 bKO	F13-137-978	F12-616-858	F12-77-895	0	0			
Hacd2 G09 bKO	F5-27-57	16/05/16	1	0				08/01/17	5	B6	M147	F4-15-27	M95					

B6	F139	20/07/16	1	0			08/01/17	8	Hacd1 99 bKO	F9-669-830	ND	ND						
Hacd1 99 bKO	F10-138-861	20/11/16	1	1	0	23/03/2017	0	06/03/17	4	Hacd1 99 bKO	F10-138-865	F138	F9-678-813	0	0			Souriceaux de 2 semaines environ
B6	F135	20-23/07/2016??	3	1	0	02/05/2017	0	01/05/17	ND	ND	ND	F99	M80	0	0			
Flp	F9-97-55	24/08/16	2	0				09/01/17	9	B6	M132	ND	ND					MB 11/11/16
B6	F156	25/11/16	2	1	1	04/05/2017	0	26/04/17	2	Hacd2 A10 Flox	F8-139-216	F146	M143	0	1	F salle 17	29/04/2017	
Hacd2 G09 Flox	F4-71-160	07/07/16	1	0				10/01/17	9	B6	M148	F3-65-71	M95					
Hacd1 99 bKO	F9-678-809	11/07/16	1	0				10/01/17	7	B6	M130	F8-496-678	M85					
B6	F155	25/11/16	2	1	0	11/05/2017	0	02/05/17	3	Hacd2 A10 Flox	F8-139-216	F146	M143	0	0			Femelles B6 du 25/11/2016
Hacd1 302 bKO	F12-616-858	06/05/16	2	0				10/01/17	10	B6	M134	F11-56-616	M4					
Hacd1 99 cKO	F9-116-852	09/06/16	1	0				14/01/17	7	B6	M145	F116	F8-638-759					
Hacd2 A10 bKO	F6-145-258	04/05/16	ND	0				14/01/17	4	Hacd1 Swiss	F14-761-881	ND	ND					
Hacd2 A10 bKO	F6-37-194	13/03/16	1	0				16/01/17	5	Hacd1 Swiss	F14-775-847	F5-63-37	F4-58-113					
HSA Cre ERT2	F1606	26/06/16	2?	0				24/01/17	4	Hacd1 99 cKO	F9-755-822	ND	ND					
Hacd2 A10 Flox	F7-100-155	07/05/16	1	0				29/01/17	4	B6	M141	F100	F6-3-134					
B6	F138	20/07/16	2	0				31/01/17	9	Hacd2 A10 cKO	F6-71-142	F99	M80					MB 20/11/16
B6	F146	06/08/16	2	0				31/01/17	9	Hacd2 A10 bKO	F6-176-302	ND	ND					MB 25/11/16
MHC Cre	F6-89-77	17/08/16	2	0				01/02/17	7	B6	M134	ND	ND					MB le 20/11/16
Hacd2 A10 cKO	F6-71-136	12/07/16	1	1	0	26/05/2017	0	12/05/17	7	Cx40 ERT2 Cre	F1-560783-11	F5-61-71	M94	0	0			
MHC Cre	F6-89-78	17/02/16	2	0				01/02/17	8	B6	M134	ND	ND					MB le 19/11/16
HSA Cre ERT2	F5-4-48	15/02/16	1	0				02/02/17	2	B6	M148	F4	F4-20-26					
Hacd2 A10 Flox	F7-100-154	07/05/16	1	0				02/02/17	7	B6	M141	F100	F6-3-134					
Hacd2 A10 bKO	F6-175-282	24/07/16	1	0				03/02/17	5	Hacd2 A10 bKO	F6-175-285	F5-5-175	M88					
PGK Cre	F5-99-34	13/04/16	2	0				16/02/17	8	B6	M132	F99	F4-15-31					
B6	F149	25/11/16	1	0				18/02/17	5	Hacd1 Cx40 ERT2	M500783	F89	M132					
B6	F164	25/11/16	1	0				18/02/17	2	Hacd2 G09 cKO	F2-135-21	F100	M132					
Hacd2 G09 Flox	F4-70-179	15/08/16	ND	0				24/02/17	8	Hacd2 G09 flox	F4-70-174	ND	ND					
B6	F137	20/07/16	2	0				25/02/17	8	Hacd2 A10 cKO	F6-71-142	F99	M80					MB 19/11/16
Hacd2 G09 Flox	F6-36-62	20/05/16	1	0				05/03/17	5	Hacd2 G09 Flox	F5-34-74	F5-27-36	M11					
Hacd1 99 bKO	F10-138-860	20/11/16	1	0				05/03/17	5	Hacd1 99 bKO	F10-138-865	F138	F9-678-813					
Hacd1 302 bKO	F13-887-964	11/11/16	1	0				06/03/17	6	Hacd1 302 bKO	F13-137-978	F12-77-887	F12-78-871					
B6	F155	25/11/16	1	0				07/03/17	10	Mesp1 Cre	F6-21-272	F146	M143					Femelles B6 du 25/11/2016
B6	F163	25/11/16	1	0				07/03/17	7	Hacd2 G09 cKO	F2-135-21	F100	M132					

Hacd1 99 bKO	F10-138-857	20/11/16	1	0				07/03/17	8	Hacd1 99 bKO	F9-669-830	F138	F9-678-813						
Hacd1 99 bKO	F10-138-862	20/11/16	1	0				07/03/17	6	Hacd1 99 bKO	F10-138-866	F138	F9-678-813						
Hacd1 302 bKO	F13-887-962	11/11/16	1	0				08/03/17	7	Hacd1 302 bKO	F12-717-971	F12-77-887	F12-78-871						
Hacd2 G09 Flox	F4-72-132	16/04/16	1	0				09/03/17	4	B6	M159	F3-65-72	F1-54-12						
B6	F156	25/11/16	1	0				09/03/17	6	Hacd2 A10 bKO	F6-175-285	F146	M143						Salle 17
HSA Cre ERT2	F1619	01/07/16	2	0				09/03/17	2	B6	M147	ND	ND						
Hacd2 G09 Flox	F4-70-177	15/08/2016	ND	0				09/03/17	8	Hacd2 G09 Flox	F4-170-172	ND	ND						
Hacd2 A10 Flox	F8-139-210	05/07/16	1	0				11/03/17	7	B6	M153	F100	F7-126-139						
Hacd1 99 bKO	F10-138-863	20/11/16	1	0				12/03/17	7	Hacd1 99 bKO	F10-138-866	F138	F9-678-813						
HSA Cre ERT2	F1620	01/07/16	2?	0				12/03/17	6	B6	M147	ND	ND						
Hacd2 A10 bKO	F6-175-279	24/07/16	1	0				18/03/17	9	B6	M160	F5-5-175	M88						
B6	F136	20/07/16	3	0				20/03/17	6	HSA cre	F6-72-83	F99	M80						Cannibalisme le 231116
Hacd2 A10 cKO	F6-70-132	06/07/16	2	0				26/03/17	8	B6	M161	F5-61-70	M94						
Hacd2 A10 Flox	F8-139-208	05/07/16	1	0				03/04/17	4	Hacd2 A10 Flox	F7-134-195	F100	F7-126-139						
Hacd2 G09 Flox	F4-71-160	07/07/16	2	0				05/04/17	2	Hacd2 G09 Flox	F4-70-174	F3-65-71	M95						
Hacd2 A10 bKO Swiss	2	26/12/16	1	0				12/04/17	10	Hacd2 A10 bKO Swiss	13	ND	ND						
Hacd2 A10 bKO Swiss	3	26/12/16	1	0				12/04/17	8	Hacd2 A10 bKO Swiss	13	ND	ND						
Hacd2 A10 bKO Swiss	6	26/12/16	1	0				12/04/17	10	Hacd2 A10 bKO Swiss	10	ND	ND						
Hacd2 A10 bKO Swiss	11	25/12/16	1	0				12/04/17	7	Hacd2 A10 bKO Swiss	16	ND	ND						
B6	F150	25/11/16	1	0				20/04/17	6	HSA Cre	F6-72-83	F89	M132						
B6	F138	20/07/16	3	0				24/04/17	7	Hacd2 G09 bKO	F6-57-98	F99	M80						MB 20/11/16
Hacd2 A10 Flox	F8-154-224	02/02/17	1	0				25/04/17	6	B6	M160	F7-100-154	M141						
Hacd2 A10 bKO	F7-282-323	03/02/17	1	0				25/04/17	7	B6	M158	F6-175-282	F6-175-285						
B6	F146	06/08/16	3	0				25/04/17	10	Hacd2 G09 bKO	F6-57-99	ND	ND						MB 25/11/16
MHC Cre	F7-77-115	01/02/17	1	0				26/04/17	8	B6	M153	F6-89-77	M134						
B6	F137	20/07/16	3	0				26/04/17	8	Hacd2 G09 bKO	F6-57-99	F99	M80						MB 19/11/16
Hacd1 99 Flox	F10-789-869	24/11/16	ND	0				26/04/17	5	B6	M165	ND	ND						
MHC Cre	F7-78-108	01/02/17	1	0				27/04/17	5	B6	M153	F6-89-78	M134						
Cx40 ERT2 Cre	F1-99-1	23/12/16	1	0				02/05/17	9	B6	M144	F99	M500783						
B6	F168	24/01/17	1	0				02/05/17	7	Hacd2 G09 Flox	F5-160-195	ND	ND						
Hacd1 99 bKO	F10-809-919	10/01/17	1	1	0	24/06/2017	0	19/06/17	9	Hacd1 99 cKO HSA Cre ERT2	F10-1619-899	F9-678-809	M130	0	0				
Hacd1 99 bKO	F10-138-858	20/11/16	1	1	0	30/08/2017	0	13/08/17	7	Hacd1 99 bKO	F10-809-921	F138	F9-678-813	0	0				

Hacd2 A10 bKO	F6-175-282	24/07/16	2	0				08/05/17	6	B6	M158	F5-5-175	M88						
Hacd1 99 cKO	F10-852-946	14/01/17	1	0				10/05/17	9	B6	M133	F9-116-852	M145						
Hacd2 A10 cKO	F7-138-145	31/01/17	1	0				11/05/17	9	Cx40 Cre ERT2	F1-500783-11	F138	F6-71-142						
PGK Cre	F6-34-53	08/12/16	1	1	0	31/08/2017	0	19/08/17	11	B6	M199	F5-99-34	M134	0	0				
B6	F163	25/11/16	2	0				12/05/17	8	Hacd2 A10 bKO	F7-278-322	F100	M132						
Hacd1 99 cKO	F10-855-933	06/01/17	1	0				14/05/17	3	B6	M133	F9-116-855	M145						
MHC Cre	F7-77-115	01/02/17	2	1	1	10/09/2017	0	21/08/17	3	B6	M195	F6-89-77	M134	0	ND				
Hacd2 G09 cKO Flp	F2-135-20	20/11/16	1	0				14/05/17	8	B6	M154	F135	F1-98-4						
B6	F149	25/11/16	2	0				14/05/17	8	Hacd2 A10 bKO	F7-278-322	F89	M132						
Hacd2 A10 bKO	F6-145-259	04/05/16	2	0				22/05/17	2	Cx40 ERT2 Cre	F1-500783-10	F5-102-145	M83						
B6	F167	24/01/17	1	0				24/05/17	8	Hacd1 99 Flox	F10-788-874	ND	ND						
Cx40 ERT2 Cre	F1-500783-13	18/02/17	1	0				26/05/17	9	Cx40 Cre ERT2	F7-146-317	F149	M500783						
Hacd2 G09 cKO	F3-163-30	07/03/17	1	0				27/05/17	5	B6	M153	F163	F2-135-21						
Hacd2 G09 cKO	F3-163-31	07/03/17	1	0				28/05/17	6	B6	M153	F163	F2-135-21						
Hacd2 A10 Flox	F9-210-229	11/03/17	1	0				01/06/17	5	B6	M154	F8-139-210	M153						
Hacd2 A10 bKO	F7-146-312	31/01/17	1	0				07/06/17	6	B6	M165	F146	F6-176-302						
Hacd2 G09 Flox	F5-160-189	10/01/17	1	0				11/06/17	5	Hacd2 G09 Flox	F5-179-199	F4-71-160	M148						
B6	F150	25/11/16	2	0				13/06/17	7	HSA Cre	F7-136-90	F89	M132						
Hacd1 99 bKO	F10-139-914	08/01/17	1	0				15/06/17	4	Hacd1 99 cKO HSA Cre ERT2	F10-1605-885	F139	F9-669-830						
Hacd2 A10 bKO x Swiss	F1-6-361	12/04/17	1	0				15/06/17	7	Hacd2 A10 bKO x Swiss	F1-6-362	6	10						
Hacd1 99 cKO HSA Cre ERT2	F10-1605-883	10/12/16	1	0				18/06/17	8	Hacd1 99 bKO	F10-809-921	F1605	F9-755-822						
Hacd1 99 cKO HSA Cre ERT2	F10-1606-942	27/12/16	1	0				20/06/17	8	Hacd1 99 bKO	F10-136-926	F1606	F9-755-822						
Hacd1 99 bKO	F10-136-923	07/01/17	1	0				20/06/17	7	Hacd1 99 cKO HSA Cre ERT2	F10-1620-892	F136	F9-669-830						
Hacd1 99 bKO	F10-139-910	08/01/17	1	0				20/06/17	10	Hacd1 99 cKO HSA Cre ERT2	F10-1620-889	F139	F9-669-830						
Hacd1 99 bKO	F10-809-916	10/01/17	1	0				21/06/17	7	Hacd1 99 cKO HSA Cre ERT2	F10-1619-899	F9-678-809	M130						
B6	F167	24/01/17	2	1	1	08/10/2017	0	22/09/17	2	Hacd1 302 bKO	F13-889-1036	ND		ND	1	ND	04/10/2017	Souriceaux adoptés du 22/09, mère morte ENA	
Hacd1 99 cKO	F11-946-997	10/05/17	1	1	0	19/11/2017	0	10/11/17	10	HSA Cre ERT2	F1-1620-7	F10-852-946	M133	0	1	ND	ND	10 souriceaux + 3 adoptés ?	
PGK Cre	F5-99-38	13/04/16	1	1	0	29/11/2017	ND	20/11/16	7	B6	M134	F99	F4-15-31	0	ND				
HSA Cre	F7-136-86	20/03/17	1	0				28/06/17	9	B6	M152	F136	F6-72-83						
Hacd1 99 bKO	F10-138-860	20/11/16	2	0				28/06/17	3	ND	F10-1619-901	F138	F9-678-813						
Hacd1 99 bKO	F10-138-863	20/11/16	2	0				30/06/17	2	Hacd1 99 cKO HSA Cre ERT2	F10-1620-889	F138	F9-678-813						

B6	F171	06/04/17	1	0				20/07/17	8	Hacd2 A10 bKO	F7-278-322	ND	ND				
B6	F191	26/04/17	1	0				29/07/17	5	Hacd1 99 bKO	F10-136-926	ND	ND				
Mesp1 Cre	F7-157-27	21/03/17	1	0				30/07/17	9	B6	M179	F157	F6-21-272				
B6	F169	06/04/17	1	0				30/07/17	7	Hacd2 G09 cKO	F2-135-21	ND	ND				
B6	F174	06/04/17	1	0				30/07/17	8	Hacd2 A10 bKO	F7-278-323	ND	ND				
Hacd2 A10 cKO	F7-137-154	25/02/17	1	0				31/07/17	8	B6	M194	F137	F6-71-142				
HSA Cre ERT2	F1-1620-4	12/03/17	1	0				31/07/17	10	B6	M178	F1620	M147				
HSA Cre	F8-150-99	13/06/17	1	1	0	09/01/2018	0	30/12/17	9	B6	M178	ND	ND	ND	0		
Mesp1 Cre	F7-157-26	21/03/17	1	0				31/07/17	7	B6	M179	F157	F6-21-272				
Hacd2 A10 Flox	F9-224-243	25/04/17	1	0				01/08/17	13	B6	M193	F8-154-224	M160				
B6	F192	26/04/17	1	0				01/08/17	3	Hacd1 99 bKO	F10-136-926	F135	M147				
Hacd2 A10 cKO	F7-137-153	25/02/17	1	0				02/08/17	5	B6	M194	F137	F6-71-142				
B6	F190	26/04/17	1	0				02/08/17	7	Hacd1 302 bKO	F13-889-1036	F135	M147				
HSA Cre ERT2	F1-1620-3	12/03/17	1	0				04/08/17	7	B6	M178	F1620	M147				
Hacd2 G09 bKO	F7-146-106	25/04/17	1	0				05/08/17	6	B6	M207	F146	F6-57-99				
Hacd2 G09 bKO	F7-146-109	25/04/17	1	0				07/08/17	6	B6	M207	F146	F6-57-99				Décédée le 16/08/17, ENA?
Cx40 ERT2 Cre	F1-500783-4	19/02/17	1	0				11/08/17	11	Cx40 ERT2 Cre	F1-5007-56-2	F135	M500783				
Cx40 ERT2 Cre	F1-500783-5	19/02/17	1	0				11/08/17	5	Cx40 ERT2 Cre	F1-500786-3	F135	M500783				
B6	F170	06/04/17	1	0				11/08/17	7	Hacd2 G09 cKO	F2-135-21	ND	ND				
Hacd1 99 bKO	F10-139-910	08/01/17	2	0				12/08/17	11	Hacd1 99 bKO	F10-138-866	F139	F9-669-830				
Hacd1 99 bKO	F10-139-911	08/01/17	1	0				13/08/17	3	Hacd1 99 bKO	F10-138-866	F139	F9-669-830				
Hacd1 99 bKO	F11-858-1037	13/08/17	1	1	1	16/01/2018	0	12/01/18	5	Hacd1 99 bKO	F11-9166-1066	ND	ND	0	0		Souriceaux morts avant le génotypage
Hacd1 99 bKO	F10-136-923	07/01/17	2	0				13/08/17	10	Hacd1 99 bKO	F10-809-921	F136	F9-669-830				
Hacd1 99 bKO	F11-862-973	07/03/17	1	0				14/08/17	4	Hacd1 99 bKO	F10-138-865	F10-138-862	F10-138-866				
MHC Cre	F8-115-122	26/04/17	1	0				14/08/17	9	B6	M195	F7-77-115	M153				
Hacd1 302 bKO	F14-964-1058	06/03/17	1	0				15/08/17	7	Hacd1 302 bKO	F13-858-1046	F13-887-964	F13-137-978				
Hacd1 302 bKO	F14-964-1057	06/03/17	1	0				22/08/17	5	Hacd1 302 bKO	F13-858-1046	F13-887-964	F13-137-978				
PGK Cre	F6-34-51	08/12/16	1	0				26/08/17	8	B6	M199	F5-99-34	M134				
B6	F189	26/04/17	1	0				27/08/17	8	Hacd1 302 bKO	F13-889-1036	F135	M147				
B6	F204	26/05/17	1	1	0	11/02/2018	ND	30/01/18	7	PGK Cre	F7-57-76	ND	ND	ND	ND		
Hacd2 A10 Flox	F9-224-240	25/04/17	1	0				02/09/17	9	B6	M193	F8-154-224	M160				
B6	F172	06/04/17	1	0				10/09/17	9	Hacd2 A10 cKO	F7-138-149	ND	ND				

Hacd1 99 bKO	F10-809-916	10/01/17	2	0				12/09/17	8	B6	M195	F9-678-809	M130						
Hacd1 302 bKO	F13-889-1035	07/01/17	1	0				13/09/17	8	Hacd1 302 bKO	F13-858-1047	F12-77-889	M134						
Hacd1 302 bKO	F14-964-1057	06/03/17	2	0				16/09/17	4	Hacd1 302 bKO	F13-858-1046	F13-887-964	F13-137-978						
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F11-910-47	20/06/17	1	0				01/10/17	4	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F11-910-48	F10-139-910	F10-1620-889						
HSA Cre ERT2	F12-996-1086	23/10/17	1	1	0	21/02/2018	0	01/02/18	7	B6	M207	F11-946-996	F1-1620-7	0	1	F204	11/02/2018	2 adoptés + 7 souriceaux	
mTmG	F1-1-1	14/05/17	1	0				21/10/17	8	mTmG	F1-1-4	ND	ND						
Hacd1 99 cKO	F11-946-996	10/05/17	1	0				23/10/17	6	HSA Cre ERT2	F1-1620-7	F10-852-946	M133						
Hacd1 99 bKO	F11-923-1027	13/08/17	1	1	0	07/03/2018	0	23/02/18	5	Hacd1 99 bKO	F11-916-1066	F10-136-923	F10-809-921	0	0				
HSA cre ERT2	F2-4-19	31/07/17	1	0				23/10/17	6	Hacd1 99 cKO	F11-191-1020	ND	ND						
HSA cre ERT2	F2-3-9	04/08/17	1	0				24/10/17	8	Hacd1 99 cKO	F11-192-1023	F1-1620-3	M178						
B6	Fxxx	xx/01/2018	ND	1	ND	12/04/2018	ND	xx/01/2018	ND	ND	ND	F206?	ND			ND			
Hacd1 99 cKO	F11-933-1005	14/05/17	1	0				25/10/17	8	HSA Cre ERT2	F1-1620-8	F10-855-933	M133						
Hacd1 99 bKO	F11-858-1039	13/08/17	2	1	0	03/05/2018	0	11/04/18	2	Hacd1 99 bKO	F11-192-1023	F10-138-858	F10-809-921	1	0				3 souriceaux morts sur 5; compatible avec ENA. Fausse couche le 070318
HSA Cre ERT2	F2-4-17	31/07/17	1	0				28/10/17	7	Hacd1 99 cKO	F11-191-1020	F1-1620-4	M178						
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F11-910-47	20/06/17	2	0				31/10/17	7	Hacd1 99 cKO HSA Cre ERT2 x bKO	F11-910-48	F10-139-910	F10-1620-889						
B6	F191	26/04/17	2	0				05/11/17	8	Hacd1 99 cKO	F11-933-1006	F135	M147						
HSA Cre ERT2	F1-1620-3	12/03/17	2	0				08/11/17	6	B6	M179	F1620	M147						
Hacd1 302 bKO	F15-1089-1141	12/01/18	1	1	0	03/06/2018	0	18/05/18	6	DNM2 KO	DNM2-53	F14-189-1089	F14-190-1073	0	0				
B6	F169	06/04/17	3	0				10/11/17	6	Hacd2 G09 Flox	F6-189-248	ND	ND						Fausse-couche le 310817
B6	F192	26/04/17	2	0				19/11/17	2	Hacd1 99 cKO	F11-933-1006	F135	M147						
HSA Cre ERT2	F1-1620-4	12/03/17	2	0				29/11/17	6	B6	M179	F1620	M147						
Cx40 ERT2 Cre	F2-4-37	11/08/17	1	0				03/12/17	6	Cx40 ERT2 Cre	F2-4-40	F1-5007-83-4	F1-5007-56-2						
B6	F190	26/04/17	2	0				03/12/17	6	HSA Cre ERT2	F1-1620-7	ND	ND						
Hacd2 A10 Flox	F10-243-261	01/08/17	ND	0				28/12/17	3	B6	M214	ND	ND						
Hacd2 G09 cKO	F3-170-62	11/08/17	1	0				29/12/17	6	B6	M179	ND	ND						
B6	F171	06/04/17	2	0				29/12/17	6	Hacd1 302 bKO	F14-190-1075	ND	ND						
B6	F172	06/04/17	2	0				29/12/17	2	Hacd2 G09 bKO	F8-106-143	ND	ND						
B6	F189	26/04/17	2	0				29/12/17	3	Hacd2 G09 bKO	F8-106-143	ND	ND						
Hacd2 A10 cKO	F8-154-176	02/02/17	1	0				30/12/17	9	B6	M212	F7-100-154	M141						
B6	F205	26/05/17	1	0				30/12/17	4	Hacd1 302 bKO	F14-190-1075	ND	ND						
B6	F191	26/04/17	3	0				01/01/18	6	MHC Cre	F9-122-140	F135	M147						

B6	F210	30/06/17	1	0				11/01/18	7	MHC Cre	F9-122-140	F151	M160						
Hacd1 302 bKO	F14-189-1091	27/08/17	1	0				11/01/18	5	Hacd1 302 bKO	F14-167-1109	F189	F13-889-1036						
Hacd1 302 bKO	F14-189-1089	27/08/17	1	0				12/01/18	7	Hacd1 302 bKO	F14-190-1073	F189	F13-889-1036						
Hacd1 99 bKO	F11-923-1028	13/08/17	1	0				15/01/18	3	Hacd1 99 bKO	F11-191-1020	F10-136-923	F10-809-921						
Hacd1 302 bKO	F14-162-1111	01/10/17	1	0				15/01/18	2	Hacd1 302 bKO	F14-167-1109	F162	F13-889-1038						
Hacd2 G09 bKO	F3-170-60	11/08/17	1	0				16/01/18	9	B6	M179	F170	F2-135-21						
Hacd2 A10 Flox	F10-243-262	01/08/17	1	0				17/01/18	9	B6	M214	F9-224-243	M193						
B6	F203	26/05/17	1	0				29/01/18	3	Hacd1 99 bKO	F11-192-1023	F136	M160						
B6	F206	26/05/17	1	0				01/02/18	9	PGK Cre	F7-53-76	F136	M160						
Hacd2 A10 cKO	F8-172-182	10/09/17	1	0				08/02/18	7	PGK Cre	F7-51-73	F172	F7-138-149						
PGK Cre	F7-51-66	26/08/17	1	0				10/02/18	8	Hacd2 A10 cKO	F8-158-172	F6-34-51	M199						
Hacd2 A10 Flox	F11-262-286	17/01/18	1	1	0	07/06/2018	0	31/05/18	3	B6	M224	F10-243-262	M214	0	0				
Hacd1 99 bKO	F11-191-1016	29/07/17	1	0				22/02/18	6	Hacd1 99 bKO	F11-191-1020	F191	F10-136-926						
Hacd1 302 bKO	F14-189-1089	27/08/17	2	0				22/02/18	8	Hacd1 302 bKO	F14-167-1109	F189	F13-889-1036						
Hacd1 99 bKO	F12-1016-1120	22/02/18	1	1	0	02/07/2018	1	21/06/18	8	Hacd1 99 bKO	F12-1027-1127	F11-191-1016	F11-191-1020	0	0				
Hacd1 302 bKO	F14-190-1070	02/08/17	1	0				26/02/18	5	Hacd1 302 bKO	F14-190-1073	F190	F13-889-1036						
B6	F171	06/04/17	3	0				13/03/18	7	Hacd2 A10 bKO	F7-282-390	ND	ND						
Hacd1 99 cKO	F12-209-114	31/12/17	1	0				15/03/18	8	Hacd1 99 bKO HSA Cre ERT2	F3-9-1075	F209	F11-933-1006						
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-999-72	23/10/17	1	0				16/03/18	3	Hacd1 99 bKO	F11-191-1020	F11-946-999	F1-1620-8						
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-191-1088	05/11/17	1	0				16/03/18	6	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F3-19-1072	F191	F11-933-1006						
Hacd1 99 cKO HSA Cre ERT2	F12-997-98	10/11/17	1	0				16/03/18	9	Hacd1 99 bKO	F12-7-106	F11-946-997	F1-1620-7						
Hacd1 99 cKO	F12-209-116	31/12/17	1	0				16/03/18	3	Hacd1 99 bKO HSA Cre ERT2	F3-9-1076	F209	F11-933-1006						
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F3-17-81	28/10/17	1	0				16/03/18	7	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-47-110	F2-4-17	F11-191-1020						
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F7-136-210	12/05/17	1	0				19/03/18	4	Hacd1 99 bKO	F11-191-1020	F6-71-136	F1-560783-11						
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-1005-91	25/10/17	1	0				19/03/18	8	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-17-84	F11-933-1005	F1-1620-8						
Hacd1 302 bKO	F14-189-1090	27/08/17	1	0				21/03/18	5	Hacd1 302 bKO	F14-167-1109	F189	F13-889-1036						
Hacd1 302 bKO	F14-190-1072	02/08/17	2	0				21/03/18	7	Hacd1 302 bKO	F14-190-1075	F190	F13-889-1036						Cannibalisme le 260218
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-209-118	31/12/17	1	0				23/03/18	6	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F3-9-1075	F209	F11-933-1006						
HSA Cre ERT2	F13-1086-45	01/02/18	1	1	0	25/08/2018	0	17/08/18	7	B6	M235	F12-996-1086	M207	1	0				
Hacd1 302 bKO	F14-190-1071	02/08/17	1	0				25/03/18	4	Hacd1 302 bKO	F14-190-1073	F190	F13-889-1036						
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-17-83	28/10/17	1	0				26/03/18	7	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-47-110	F2-4-17	F11-191-1020						

Hacd1 302 bKO	F15-171-1135	29/12/17	1	0				14/06/18	9	Hacd2 G09 bKO	F8-106-143	F171	F14-190-1075				
Hacd1 302 bKO	F15-1090-1157	21/03/18	1	0				14/06/18	8	Hacd1 302 bKO	F15-1072-1167	F14-189-1090	F14-167-1109				
Hacd1 99 bKO	F12-1038-1112	13/01/18	1	0				15/06/18	9	Hacd1 99 bKO	F12-1027-1126	F11-858-1038	F11-916-1066				
Hacd1 99 bKO	F12-1016-1121	22/02/18	1	0				15/06/18	8	Hacd1 99 bKO	F12-1027-1127	F11-191-1016	F11-191-1020				
Hacd1 99 bKO	F12-1016-1122	22/02/18	1	0				15/06/18	8	Hacd1 99 bKO	F12-1027-1128	F11-191-1016	F11-191-1020				
Hacd1 302 bKO	F15-1072-1161	21/03/18	1	0				15/06/18	6	Hacd1 302 bKO	F15-1072-1163	F14-190-1072	F14-190-1075				
Hacd1 302 bKO	F15-1090-1156	21/03/18	1	0				15/06/18	8	Hacd1 302 bKO	F15-1072-1166	F14-189-1090	F14-167-1109				
Hacd1 302 bKO	F15-1090-1158	21/03/18	1	0				16/06/18	7	Hacd1 302 bKO	F15-1072-1167	F14-189-1090	F14-167-1109				
Hacd1 302 bKO DNM2	F16-1161-1239	15/06/18	1	1	0	07/11/2018	0	26/10/18	9	DNM2	F15-1139-1178	F15-1072-1161	F15-1072-1163	0	0		
Hacd2 A10 Flox	F12-286-294	31/05/18	1	1	1	08/11/2018	0	26/10/18	4	B6	M236	F11-262-286	M224	1	1	ND	04/11/2018
Hacd2 G09 Flox	F7-228-255	29/12/17	1	0				18/06/18	10	B6	M225	F6-166-228	M211				
Hacd1 99 bKO	F11-191-1019	29/07/17	1	0				22/06/18	7	CD9 KO	1363	F191	F10-136-926				
B6	F221	04/12/17	1	0				22/06/18	6	Hacd2 G09 bKO	F9-172-152	ND	ND				
Hacd1 99 bKO	F12-1038-1113	13/01/18	1	0				23/06/18	3	Hacd1 99 bKO	F12-1027-1126	F11-858-1038	F11-916-1066				
Hacd2 A10 bKO	F16-390-436	13/03/18	1	1	0	09/12/2018	0	24/11/18	7	B6	M244	F171	F7-282-390	0	0		
Hacd1 302 bKO	F15-1070-1168	26/02/18	1	0				27/06/18	5	Hacd1 302 bKO	F15-1072-1166	F14-190-1070	F14-190-1073				
B6	F223	04/12/17	2	0				29/06/18	8	HSA Cre	F9-99-122	F206	M178				
Hacd1 A10 KOnul	F8-74-228	30/12/17	2	0				29/06/18	10	B6	M218	F7-51-74	F8-153-172				
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-72-136	16/03/18	1	0				18/07/18	8	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-83-152	F12-999-72	F11-191-1020				
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-83-151	26/03/18	1	0				18/07/18	6	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-1088-164	F12-17-83	F12-47-110				
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-1088-161	16/03/18	1	0				19/07/18	7	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-116-123	F12-191-1088	F3-19-1072				
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-98-124	16/03/18	1	0				19/07/18	5	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-997-104	F12-997-98	F12-7-106				
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-91-176	19/03/18	1	0				19/07/18	8	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-999-75	F12-1005-91	F12-17-84				
B6	F232	20/04/18	1	1	0	15/12/2018	0	05/12/18	6	Hacd2 G09 bKO	F9-189-155	ND	ND	ND	0		
Hacd1 99 cKO HSA Cre ERT2	F12-997-98	10/11/17	2	0				20/07/18	8	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-81-172	F11-946-997	F1-1620-7				
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-996-1084	23/10/17	1	0				21/07/18	4	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-1088-164	F11-946-996	F1-1620-7				
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-98-127	16/03/18	1	0				21/07/18	5	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-198-131	F12-997-98	F12-7-106				
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-91-174	19/03/18	1	0				21/07/18	8	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-999-75	F12-1005-91	F12-17-84				
B6	F240	21/06/18	1	1	0	16/12/2018	0	30/11/18	6	Hacd2 G09 bKO	F9-189-155	ND	ND	ND	0		
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-81-168	16/03/18	1	0				23/07/18	7	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-83-152	F12-17-81	F12-47-110				
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-72-137	16/03/18	1	0				24/07/18	7	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-116-123	F12-999-72	F11-191-1020				

Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-98-128	16/03/18	1	0				24/07/18	5	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-98-131	F12-997-98	F12-7-106				
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-999-72	23/10/17	2	0				27/07/18	2	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-81-172	F11-946-999	F1-1620-8				
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F3-17-81	28/10/17	2	0				01/08/18	4	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-47-110	F2-4-17	F11-191-1020				
B6	F222	04/12/17	2	0				01/08/18	6	Cx40 ERT2 Cre	F3-37-46	ND	ND				
Hacd2 A10 bKO	F9-430-444	21/04/18	1	0				02/08/18	4	B6	M236	F8-174-430	M215				
HSA Cre ERT2	F13-1086-46	01/02/18	1	0				03/08/18	7	B6	M235	F12-996-1086	M207				
Hacd2 A10 Konul	F9-228-306	20/04/18	1	0				03/08/18	9	B6	M217	F8-74-228	M211				
mTmG	F2-1-15	28/03/18	1	0				05/08/18	7	mTmG	F2-1-18	F1-1-1	F2-1-12				
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-17-83	28/10/17	2	0				05/08/18	8	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F12-47-111	F2-4-17	F11-191-1020				
Hacd2 A10 bKO	F16-390-439	13/03/18	1	0				06/08/18	6	B6	M236	F171	F7-282-390				
CD9 KO	F12-1019-13	22/06/18	1	1	0	16/01/2019	0	05/01/19	9	B6	M245	F11-191-1019	1363	0	0		
PGK Cre	F8-204-79	30/01/18	1	0				07/08/18	10	B6	M234	F204	F7-57-76				
Cx40 ERT2 Cre	F2-5-27	11/08/17	2	0				07/08/18	8	B6	M215	F1-500783-5	F1-500786-3				
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F13-114-142	15/03/18	1	0				14/08/18	4	Hacd1 99 bKO	F12-7-106	F12-209-114	F3-9-1075				
Hacd1 99 cKO	F12-1005-1136	21/04/18	1	0				14/08/18	5	Hacd1 99 cKO	F12-209-120	F11-933-1005	F12-192-1096				
Hacd1 99 bKO	F12-1039-1133	11/04/18	1	0				15/08/18	4	Hacd1 99 bKO	F12-1027-1128	F11-858-1039	F11-192-1023				
Hacd1 99 bKO	F12-1027-1125	23/02/18	2	0				15/08/18	8	Hacd1 99 bKO	F12-1027-1129	F11-923-1027	F3-9-1075				
Hacd1 99 bKO	F12-1016-1122	22/02/18	2	0				16/08/18	6	Hacd1 99 bKO	F12-1027-1127	F11-191-1016	F11-191-1020				
Hacd1 302 bKO	F15-1072-1162	21/03/18	2	0				16/08/18	6	Hacd1 302 bKO	F15-1072-1163	F14-190-1072	F14-190-1075				
Hacd1 302 bKO	F15-1090-1157	21/03/18	2	0				16/08/18	9	Hacd1 302 bKO	F15-1072-1163	F14-189-1090	F14-167-1109				
Hacd1 99 bKO	F12-1016-1121	22/02/18	2	0				17/08/18	9	Hacd1 99 bKO	F12-1027-1127	F11-191-1016	F11-191-1020				
Hacd1 302 bKO	F15-1090-1158	21/03/18	2	0				17/08/18	10	Hacd1 302 bKO	F15-1072-1167	F14-189-1090	F14-167-1109				
Hacd1 99 bKO	F12-1038-1111	13/01/18	1	0				18/08/18	11	Hacd1 99 bKO	F12-1039-1134	F11-858-1038	F11-916-1066				
Hacd1 99 bKO	F12-223-1140	21/04/18	1	0				18/08/18	8	Hacd1 99 bKO	F12-1039-1134	F223	F11-916-1066				
Hacd1 302 bKO	F16-1157-1274	16/08/18	1	1	0	06/02/2019	0	24/01/19	11	Hacd1 302 bKO	F16-1156-1344	F15-1090-1157	F15-1072-1163	0	0		
PGK Cre	F8-204-78	30/01/18	1	0				20/08/18	8	B6	M234	F204	F7-57-76				
Hacd1 99 bKO	F12-1038-1112	13/01/18	2	0				20/08/18	10	Hacd1 99 bKO	F12-1027-1129	F11-858-1038	F11-916-1066				
Hacd1 302 bKO	F15-1072-1161	21/03/18	2	0				27/08/18	8	Hacd1 302 bKO	F15-1072-1167	F14-190-1072	F14-190-1075				
Hacd1 302 bKO	F16-1158-1242	16/06/18	1	0				04/09/18	7	Hacd1 302 bKO	F16-1157-1223	F15-1090-1158	F15-1072-1167				
Hacd1 302 bKO	F15-1111-1040	15/01/18	2	0				04/09/18	5	Hacd1 302 bKO	F15-1072-1165	F14-162-1111	F14-167-1109				
Hacd1 99 bKO	F12-1028-1113	15/01/18	1	0				05/09/18	6	Hacd1 99 bKO	F12-223-1143	F11-923-1028	F11-191-1020				

Hacd1 302 bKO	F16-1158-1243	16/06/18	1	0			05/09/18	9	Hacd1 302 bKO	F16-1157-1223	F15-1090-1158	F15-1072-1167						
Hacd1 302 bKO	F15-1089-1142	12/01/18	2	0			05/09/18	10	Hacd1 302 bKO	F15-1072-1166	F14-189-1089	F14-190-1073						
Hacd1 302 bKO	F16-1157-1273	16/08/18	1	1	0	13/02/2019	0	11/02/19	7	Hacd1 302 bKO	F16-1156-1344	F14-189-1090	F14-167-1109	0	0			
Hacd1 302 bKO	F16-1156-1229	15/06/18	1	0			09/09/18	6	Hacd1 302 bKO	F16-1157-1224	F15-1090-1156	F15-1072-1166						
Hacd1 99 bKO	F13-1122-1173	15/06/18	1	0			09/09/18	2	Hacd1 99 bKO	F12-223-1142	F12-1016-1122	F12-1027-1128						
Hacd1 99 bKO	F13-1122-1174	15/06/18	1	0			15/09/18	8	Hacd1 99 bKO	F12-223-1143	F12-1016-1122	F12-1027-1128						
Hacd2 A10 cKO	F9-193-207	16/04/18	1	0			20/09/18	4	Hacd2 A10 cKO	F9-193-213	F8-172-193	F8-172-188						
Hacd1 302 bKO	F16-1156-1232	15/06/18	1	0			20/09/18	8	Hacd1 302 bKO	F16-1157-1224	F15-1090-1156	F15-1072-1166						
Hacd2 G09 bKO	F10-222-157	19/05/18	1	0			21/09/18	8	B6	M236	F222	F9-172-152						
Hacd2 G09 bKO	F10-222-159	19/05/18	1	0			21/09/18	9	B6	M236	F222	F9-172-152						
PGK Cre	F8-204-78	30/01/18	2	0			21/09/18	5	B6	F234	F204	F7-57-76						
Hacd1 302 bKO	F15-1090-1156	21/03/18	2	0			21/09/18	9	Hacd1 302 bKO	F15-1072-1166	F14-189-1090	F14-167-1109						
Hacd1 99 bKO	F13-1121-1190	15/06/18	1	0			24/09/18	8	Hacd1 99 bKO	F13-1112-1185	F12-1016-1121	F12-1027-1127						
B6	F228	20/04/18	1	0			26/09/18	7	Hacd2 A10 Flox	F12-286-296	ND	ND						
Hacd1 99 bKO	F13-1125-1202	13/06/18	1	0			03/10/18	6	Hacd1 99 bKO	F13-1112-1185	F12-1027-1125	F12-1027-1128						
Hacd1 302 bKO DNM2	F16-1142-1194	17/05/18	1	0			06/10/18	10	Hacd1 302 bKO DNM2	F15-1139-1180	F15-1089-1142	DNM2-53						
DNM2	F1-11-8	11/06/18	1	0			06/10/18	9	Hacd1 99 bKO x DNM2	F12-10-1162	DNM2-11	F11-916-1066						
Hacd1 302 bKO	F15-1070-1168	26/02/18	2	0			07/10/18	5	DNM2	F15-1139-1178	F14-190-1070	F14-190-1073						
DNM2	F12-10-1161	16/05/18	1	0			08/10/18	13	Hacd1 99 bKO	F12-223-1142	DNM2-10	F11-916-1066						
Hacd1 99 bKO	F12-10-1159	16/05/18	1	0			08/10/18	4	Hacd1 99 bKO x DNM2	F12-13-1156	DNM2-10	F11-916-1066						
Hacd1 99 bKO x DNM2	F12-10-1157	16/05/18	1	0			08/10/18	7	Hacd1 99 bKO x DNM2	F12-13-1156	DNM2-10	F11-916-1066						
Hacd1 302 bKO DNM2	F16-1140-1183	17/05/18	1	0			08/10/18	7	Hacd1 302 bKO DNM2	F16-1139-1179	F15-1111-1140	DNM2-54						
Hacd1 99 bKO x DNM2	F12-12-1164	17/05/18	1	0			08/10/18	10	Hacd1 99 bKO x DNM2	F1-11-12	DNM2-12	F11-192-1023						
Hacd1 302 bKO DNM2	F16-1142-1193	17/05/18	1	0			09/10/18	9	Hacd1 302 bKO DNM2	F15-1139-1180	F15-1089-1142	DNM2-53						
Hacd1 99 bKO x DNM2	F12-12-1166	17/05/18	1	0			09/10/18	12	Hacd1 99 bKO x DNM2	F1-11-12	DNM2-12	F11-192-1023						
Hacd1 99 bKO x DNM2	F12-12-1167	17/05/18	1	0			12/10/18	9	Hacd1 99 bKO x DNM2	F1-11-9	DNM2-12	F11-192-1023						
Hacd1 302 bKO DNM2	F16-1141-1203	18/05/18	1	0			15/10/18	10	Hacd1 302 bKO DNM2	F16-1140-1189	F15-1089-1141	DNM2-53						
Hacd1 302 bKO DNM2	F16-1140-1186	17/05/18	1	0			16/10/18	10	Hacd1 302 bKO DNM2	F16-1140-1192	F15-1111-1140	DNM2-54						
DNM2	F16-1142-1197	17/05/18	1	0			20/10/18	10	Hacd1 302 bKO	F15-1139-1179	F15-1089-1142	DNM2-53						
Hacd2 A10 cKO	F11-230-104	06/12/18	1	1	0	06/05/2019	0	27/04/19	4	Hacd2 A10 cKO	F10-207-237	F10-193-230	F9-193-213	0	0			
B6	F229	20/04/18	1	0			26/10/18	11	Hacd2 A10 Flox	F11-262-288	ND	ND						

B6	F231	20/04/18	1	0			30/10/18	7	Hacd2 A10 bKO	F9-219-461	ND	ND						
Hacd1 99 bKO	F14-1202-1294	03/10/18	1	1	1	20/05/2019	0	26/01/19	10	Hacd1 99 bKO	F13-1112-1185	F13-1125-1202	F13-1112-1185	0	0			
Hacd2 A10 Flox	F12-285-298	03/06/18	1	0				01/11/18	5	B6	M236	F11-262-685	M224					
Hacd1 99 bKO x DNM2	F12-12-1165	17/05/18	1	0				04/11/18	6	Hacd1 99 bKO x DNM2	F1-11-9	DNM2-12	F11-192-1023					
Hacd2 A10 bKO	F17-439-468	06/08/18	1	0				11/11/18	5	Hacd2 A10 bKO	F10-444-466	F16-390-439	M236					
Hacd2 A10 bKO	F16-390-439	13/03/18	2	0				24/11/18	6	B6	M244	F171	F7-282-390					
DNM2	F1-11-8	11/06/18	2	0				30/11/18	11	Hacd1 302 bKO	F15-1139-1179	DNM2-11	F11-916-1066					
Hacd2 A10 Konul	F8-74-228	30/12/17	3	0				30/11/18	5	B6	M235	F7-51-74	F8-153-172					
Hacd2 G09 cKO	F5-67-82	16/04/18	1	0				02/12/18	9	B6	F236	F4-62-67	F3-169-58					
B6	F119	18/08/2016?	2	0				11/12/16	3	MHC Cre	F6-89-75	ND	ND					MB 24/06/16
B6	F209	ND	1	0				31/12/17	7	Hacd1 99 cKO	F11-933-1006	ND	ND					Cannibalisme le 20/06/2018
B6	F226	ND	1	0				04/10/18	9	Mesp1 Cre	F9-42-52	ND	ND					
B6	F227	ND	1	0				30/09/18	4	Mesp1 Cre	F9-42-52	ND	ND					
B6	F233	ND	1	0				27/09/18	7	CD9 KO	F1-1354-2	ND	ND					
B6	F237	ND	2	0				18/03/19	1	Hacd2 A10 bKO	F18-468-475	ND	ND					Cannibalisme le 01/02/2019
B6	F238	ND	1	0				18/03/19	4	Hacd2 A10 bKO	F17-436-497	ND	ND					
B6	F239	ND	1	0				29/11/18	4	Hacd2 A10 Flox	F12-285-302	ND	ND					
B6	F241	ND	1	0				26/10/18	7	Hacd2 G09 Flox	F8-255-268	ND	ND					
B6	F246	ND	1	0				23/11/18	6	B6	M243	ND	ND					MB 16/03/19
B6	F247	ND	1	0				07/12/18	5	B6	M243	ND	ND					
B6	F248	ND	1	0				23/11/18	8	Hacd2 G09 bKO	F4-62-69	ND	ND					
B6	F249	ND	1	0				07/11/18	7	Hacd2 G09 bKO	F9-189-155	ND	ND					
B6	F250	ND	1	0				20/09/18	8	DNM2	F16-1140-1191	ND	ND					
B6	F253	ND	1	0				20/01/19	8	B6	M234	ND	ND					
B6	F271	ND	1	0				23/04/19	8	Hacd2 G09 bKO	F10-169-219	ND	ND					
B6	F272	ND	1	0				28/04/19	9	Hacd2 G09 bKO	F10-169-219	ND	ND					
B6	F273	ND	1	0				22/05/19	9	Hacd2 A10 bKO	F18-468-504	ND	ND					
B6	F274	ND	1	0				27/05/19	6	B6	M269	ND	ND					
B6	F275	ND	1	0				27/05/19	6	B6	M258	ND	ND					
CD9 KO	1354	ND	1	0				03/05/18	6	B6	M224	ND	ND					
Cx40 ERT2	F500786	08/01/2017??	1	0				08/01/17	2	Cx40 ERT2	M500783							
DNM2 KO	DNM2-10	ND	1	0				16/05/18	7	Hacd1 99 bKO	F11-916-1066	ND	ND					

DNM2 KO	DNM2-11	ND	1	0				11/06/18	7	Hacd1 99 bKO	F11-916-1066	ND	ND						
DNM2 KO	DNM2-12	ND	1	0				17/05/18	7	Hacd1 99 bKO	F11-192-1023	ND	ND						
DNM2 KO	DNM2-13	ND	1	0				24/05/18	8	Hacd1 99 bKO	F11-192-1023	ND	ND						
Hacd1 302 bKO	F15-1071-1156	ND	1	0				18/08/18	7	Hacd1 302 bKO	F15-1072-1164	ND	ND						
Hacd2 A10 Flox	F13-241-336	28/12/18	1	1	0	03/06/2019	0	17/05/19	8	Hacd2 A10 Flox	F13-239-333	F241	F12-285-303	0	0				
Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F11-914-7	ND	1	0				02/10/17	2	Hacd1 99 bKO/cKO HSA Cre ERT2	F11-914-8/9/10	ND	ND						
Hacd1 99 bKO	F12-10-1159	16/05/18	2	0				02/12/18	10	Hacd1 302 bKO	F15-1139-1179	DNM2-10	F11-916-1066						
Hacd1 99 bKO x DNM2	F12-12-1167	17/05/18	2	0				02/12/18	12	Hacd1 99 bKO x DNM2	F1-11-12	DNM2-12	F11-192-1023						
Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1049-1147	16/05/18	1	0				05/12/18	9	Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1049-1148	F11-910-1049	M1357						
Hacd1 302 bKO DNM2	F16-1141-1206	18/05/18	1	0				05/12/18	10	Hacd1 302 bKO DNM2	F16-1139-1180	F15-1089-1141	DNM2-53						
Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1049-7	22/06/18	1	0				05/12/18	8	Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1049-1148	F11-910-1049	1357						
Hacd2 A10 cKO	F10-193-230	20/05/18	1	0				06/12/18	4	Hacd2 A10 cKO	F9-193-213	F9-176-193	F8-172-188						
mTmG	1537	12/10/2016??	1	0				14/05/17	9	mTmG	1549	ND	ND						
Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1019-11	22/06/18	1	0				06/12/18	3	Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1019-16	F11-191-1019	1363						
Hacd1 302 bKO CD9 KO	F15-1100-1210	04/05/18	1	0				07/12/18	5	Hacd1 302 bKO CD9 KO	F15-1100-1212	F14-1035-1100	M1415						
Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1049-8	22/06/18	1	0				07/12/18	9	Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-10498-10	F11-910-1049	1357						
Hacd2 A10 Konul	F10-306-325	03/08/18	1	0				08/12/18	6	Hacd2 A10 Konul	F9-228-318	F9-228-306	M217						
Hacd1 99 bKO x DNM2	F12-10-1157	16/05/18	2	0				09/12/18	13	Hacd1 99 bKO x DNM2	F1-11-12	DNM2-10	F11-916-1066						
Hacd1 302 bKO CD9 KO	F15-1100-1209	04/05/18	1	0				11/12/18	4	Hacd1 302 bKO CD9 KO	F15-1100-1212	F14-1035-1100	M1415						
Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1049-9	22/06/18	1	0				12/12/18	10	Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1049-10	F11-910-1049	1357						
Hacd2 G09 bKO	F10-222-159	19/05/18	2	0				12/12/18	8	B6	M245	ND	ND						
Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1049-1145	16/05/18	1	0				13/12/18	9	Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1019-17	F11-910-1049	M1357						
Hacd1 99 bKO	F13-1140-1251	18/08/18	2	1	0	21/06/2019	0	15/06/19	5	Hacd1 302 bKO	F15-1212-30	F12-223-1140	F12-1039-1134	0	0				
Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1019-14	22/06/18	1	0				13/12/18	9	Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1019-15	F11-191-1019	1363						
Hacd2 G09 bKO	F9-143-169	14/06/18	1	0				27/12/18	8	B6	M244	F15-171-1135	F8-106-143						
Hacd2 G09 bKO	F10-221-161	22/06/18	1	0				27/12/18	7	B6	M256	F221	F9-172-152						
B6	F257	23/11/18	1	1	0	21/06/2019	0	16/06/19	5	Hacd2 A10 Konul	F11-325-352	F246	M243	0	0				
Hacd1 99 bKO CD9 KO	F13-1147-44	05/12/18	2	1	0	23/06/2019	0	16/06/19	10	Hacd1 99 bKO CD9 KO	F13-12-61	F12-1049-1147	F12-1049-1148	0	0				
Hacd2 A10 Flox	F12-285-298	03/06/18	2	0				28/12/18	8	B6	M236	F11-262-685	M224						
Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1049-1146	16/05/18	1	0				30/12/18	7	Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1019-17	F11-910-1049	M1357						
Hacd1 302 bKO DNM2	F16-1141-1206	18/05/18	2	0				02/01/19	7	Hacd1 302 bKO DNM2	F16-1139-1180	F15-1089-1141	DNM2-53						

B6	F231	20/04/18	2	0			05/01/19	5	CD9 KO	F1-1354-2	ND	ND							
Hacd1 99 cKO	F13-1136-278	14/08/18	1	0			08/01/19	7	Hacd1 99 cKO	F13-1135-288	F12-1005-1136	F12-209-120							
HSA Cre ERT2	F14-45-61	17/08/18	1	0			09/01/19	3	B6	M235	F13-1086-45	M235							
HSA Cre	F10-223-123	29/06/18	1	0			12/01/19	6	B6	M256	F223	F9-99-122							
Hacd1 302 bKO	F17-1274-48	24/01/19	1	1	0	28/06/2019	0	17/06/19	8	Hacd1 302 bKO	F18-1331-74	F16-1157-1274	F16-1156-1344	1	1	F13-1140-1251	21/06/2019		
Hacd2 G09 bKO	F10-222-157	19/05/18	2	0			13/01/19	2	B6	M244	F222	F9-172-152							
Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1019-12	22/06/18	1	0			15/01/19	7	Hacd1 99 bKO CD9 KO	F12-1019-15	F11-191-1019	1363							
Hacd1 302 bKO	F16-1142-1315	05/09/18	1	0			25/01/19	6	Hacd1 302 bKO	F16-1156-1342	F15-1089-1142	F15-1072-1166							
Hacd1 99 bKO	F13-1112-1236	20/08/18	1	0			27/01/19	4	Hacd1 99 bKO	F13-1112-1248	F12-1038-1112	F12-1027-1129							
Hacd1 302 bKO	F17-1242-1289	04/09/18	1	0			27/01/19	7	Hacd1 302 bKO	F16-1156-1343	F16-1158-1242	F16-1157-1223							
Hacd2 A10 bKO	F16-390-439	13/03/18	3	0			28/01/19	5	B6	M243	F171	F7-282-390							
Hacd1 99 bKO	F13-1140-1251	18/08/18	1	0			29/01/19	6	Hacd1 99 bKO	F13-1122-1231	F12-223-1140	F12-1039-1134							
Hacd2 A10 bKO	F17-439-468	06/08/18	2	0			30/01/19	10	B6	M243	F16-390-439	M236							
Hacd1 99 bKO	F13-1133-1212	15/08/18	1	0			02/02/19	7	Hacd1 99 bKO	F14-1202-1299	F12-1039-1133	F12-1027-1128							
Hacd1 99 bKO	F13-1133-1211	15/08/18	1	0			03/02/19	3	Hacd1 99 bKO	F14-1202-1299	F12-1039-1133	F12-1027-1128							
Hacd1 302 bKO	F16-1142-1316	05/09/18	1	0			03/02/19	8	Hacd1 302 bKO	F16-1156-1342	F15-1089-1142	F15-1072-1166							
Hacd2 G09 bKO	F10-222-157	19/05/18	3	0			03/02/19	5	B6	M244	F222	F9-172-152							
Hacd1 302 bKO	F17-1232-1331	20/09/18	1	0			09/02/19	8	Hacd1 302 bKO	F16-1156-1343	F16-1156-1232	F16-1157-1224							Fausse couche le 17/06/2019
HSA Cre ERT2	F14-46-53	03/08/18	1	0			14/02/19	10	B6	M258	F13-1086-46	M235							
PGK Cre	F9-78-116	21/09/18	1	0			15/02/19	7	B6	M251	F8-204-78	M234							
Hacd2 G09 Flox	F9-241-276	26/10/18	1	0			16/02/19	5	B6	M260	F241	F8-255-268							
Hacd2 G09 Flox	F9-241-275	26/10/18	1	0			17/02/19	8	B6	M260	F241	F8-255-268							
PGK Cre	F9-78-114	21/09/18	1	0			20/02/19	3	B6	M261	F8-204-78	M234							
B6	F264	07/12/18	1	0			28/02/19	3	TEK Cre	N°1	F246	M243							
Hacd1 99 bKO	F13-1121-1246	17/08/18	1	0			03/03/19	6	Hacd1 99 bKO	F13-1122-1231	F12-1016-1121	F12-1027-1127							Fausse couche le 20/05/19
Hacd2 A10 Konul	F11-232-344	05/12/18	1	0			07/03/19	4	Hacd2 A10 Konul	F10-306-327	F232	F10-306-329							
Hacd2 A10 bKO	F17-436-492	24/11/18	1	0			24/03/19	5	TEK Cre	N°3	F16-390-436	M244							
Hacd2 G09 bKO	F10-240-215	30/11/18	1	0			28/03/19	9	TEK Cre	N°1	F240	F9-189-155							
Hacd2 A10 Flox	F13-298-361	28/12/18	1	0			02/04/19	8	Hacd2 A10 Flox	F13-298-329	F12-285-298	M236							
DNM2	F17-250-150	20/09/18	1	0			03/04/19	3	B6	M259	F250	F16-1140-1191							
Hacd2 A10 Flox	F13-249-350	27/12/18	1	0			04/04/19	8	Hacd2 A10 Flox	F13-239-333	F249	F12-285-302							

Hacd2 G09 cKO	F6-82-95	02/12/18	1	0			05/04/19	8	Hacd2 G09 cKO	F6-82-101	F5-67-82	M236						
Hacd1 302 bKO CD9 KO	F16-1210-26	07/12/18	1	0			08/04/19	4	Hacd1 302 bKO CD9 KO	F16-1209-31	F15-1100-1210	F15-1100-1212						
Hacd1 99 bKO CD9 KO	F13-9-89	12/12/18	1	0			08/04/19	8	Hacd1 99 bKO CD9 KO	F13-12-61	F12-1049-14	F12-1019-15						
Hacd2 A10 Flox	F13-249-351	27/12/18	1	0			08/04/19	7	Hacd2 A10 Flox	F13-239-333	F249	F12-285-302						
Hacd1 99 bKO CD9 KO	F13-1145-69	13/12/18	1	0			09/04/19	7	Hacd1 99 bKO CD9 KO	F13-8-48	F12-1049-1145	F12-1019-17						
Hacd1 302 bKO CD9 KO	F16-1209-33	11/12/18	1	0			11/04/19	6	Hacd1 302 bKO CD9 KO	F16-1209-31	F15-1100-1209	F15-1100-1213						Fausse couche le 03/06/2019
Hacd2 G09 cKO	F6-82-94	02/12/18	1	0			14/04/19	7	Hacd2 G09 cKO	F6-82-101	F5-67-82	M236						
Hacd2 G09 bKO	F10-169-222	27/12/18	1	0			14/04/19	4	TEK Cre	N°2	F9-143-169	M244						
DNM2	F17-250-149	20/09/18	1	0			22/04/19	7	B6	M262	F250	F16-1140-1191						
Hacd1 99 bKO CD9 KO	F13-1147-44	05/12/18	1	0			22/04/19	7	Hacd1 99 bKO CD9 KO	F13-8-47	F12-1049-1147	F12-1049-1148						
Hacd2 A10 bKO	F17-439-468	06/08/18	3	0			22/04/19	8	TEK Cre	N°3	F16-390-439	M236						
Hacd1 99 bKO CD9 KO	F13-14-75	13/12/18	1	0			25/04/19	6	Hacd1 99 bKO CD9 KO	F13-12-60	ND	ND						
Hacd2 A10 cKO	F11-230-103	06/12/18	1	0			27/04/19	7	Hacd2 A10 cKO	F11-230-105	F10-193-230	F9-193-213						
Hacd1 99 bKO CD9 KO	F13-1145-70	13/12/18	1	0			27/04/19	7	Hacd1 99 bKO CD9 KO	F13-8-48	F12-1049-1145	F12-1019-17						
Hacd2 A10 bKO	F17-436-495	24/11/18	1	0			29/04/19	7	TEK Cre	N°3	F16-390-436	M244						
Hacd2 G09 Flox	F9-242-282	28/10/18	1	0			30/04/19	3	Hacd2 G09 Flox	F9-241-280	F242	F8-255-268						
Hacd2 G09 bKO	F11-157-238	03/02/19	1	0			30/04/19	3	TEK Cre	N°1	F10-222-157	M244						
Hacd1 302 bKO	F18-1289-56	27/01/19	2	1	0	08/07/2019	0	27/06/19	9	Hacd1 302 bKO	F18-1331-74	F17-1242-1289	F16-1156-1343	0	0			
Hacd2 G09 bKO	F11-157-232	13/01/19	1	0			02/05/19	6	TEK Cre	N°2	F10-222-157	M244						
B6	F283	20/01/19	1	0			03/05/19	6	B6	M265	F253	M234						
Hacd2 G09 cKO	F5-248-91	23/11/18	1	0			07/05/19	7	Hacd2 G09 cKO	F6-82-99	F248	F4-62-69						
Hacd2 G09 Flox	F9-241-275	26/10/18	2	0			07/05/19	9	Hacd2 G09 Flox	F9-241-278	F241	F8-255-268						
Hacd2 G09 Flox	F9-241-276	26/10/18	2	0			07/05/19	10	Hacd2 G09 Flox	F9-241-278	F241	F8-255-268						
Hacd2 G09 cKO	F5-248-87	23/11/18	1	0			09/05/19	6	Hacd2 G09 cKO	F6-82-101	F248	F4-62-69						
Hacd1 302 bKO	F18-1289-56	27/01/19	1	0			09/05/19	6	Hacd1 302 bKO	F17-1316-63	F17-1242-1289	F16-1156-1343						
Hacd2 A10 bKO	F17-439-502	28/01/19	1	0			09/05/19	5	TEK Cre	N°3	F16-390-439	M243						
Hacd2 G09 bKO	F11-157-235	03/02/19	1	0			09/05/19	6	TEK Cre	N°2	F10-222-157	M244						
Hacd2 A10 Flox	F14-336-382	07/05/19	1	1	0	15/11/2019	0	29/10/19	9	Hacd2 A10 Flox	F15-335-413	F13-241-336	F13-239-333	1	0			
Hacd1 302 bKO	F17-1315-59	25/01/19	1	0			10/05/19	6	Hacd1 302 bKO	F18-1289-53	F16-1142-1315	F16-1156-1342						
Hacd2 G09 bKO	F11-157-236	03/02/19	1	0			10/05/19	5	TEK Cre	N°2	F10-222-157	M244						
Hacd1 302 bKO	F17-1315-60	25/01/19	1	0			11/05/19	2	Hacd1 302 bKO	F18-1289-53	F16-1142-1315	F16-1156-1342						

Hacd1 99 bKO	F15-1212-36	02/02/19	2	0			17/06/19	11	Hacd1 99 bKO	F14-1251-16	F13-1133-1212	F14-1202-1299					Cannibalisme le 17/05/19
Hacd1 99 bKO	F11-858-1038	13/08/17	1	1	0	03/05/208	0	13/01/18	8	Hacd1 99 bKO	F11-916-1066	F10-138-858	F10-809-921	1	0		
B6	F162	ND	1	0			01/10/17	7	Hacd1 302 bKO	F13-889-1038	ND	ND					
Hacd2 A10 Flox	F13-298-361	28/12/18	2	0			19/06/19	9	Hacd2 A10 Flox	F13-298-329	F12-285-298	M326					
Hacd1 99 bKO	F13-1121-1246	17/08/18	3	0			19/06/19	1	Hacd1 99 bKO	F15-1212-36	F12-1016-1121	F12-1027-1127					Fausse couche le 20/05/19
B6	F166	ND	1	0			28/04/17	9	Hacd2 G09 Flox	F5-160-195	ND	ND					
B6	F181	ND	1?	0			30/04/17	4	Hacd2 A10 Flox	F8-154-225	ND	ND					
Hacd1 302 bKO	F17-1274-49	24/01/19	2	0			20/06/19	4	Hacd1 302 bKO	F17-1316-62	F16-1157-1274	F16-1156-1344					
Hacd2 A10 cKO	F11-230-103	06/12/18	2	0			24/06/19	10	Hacd2 A10 cKO	F11-230-105	F10-193-230	F9-193-213					
Hacd1 302 bKO	F16-1142-1315	05/09/18	2	0			25/06/19	6	Hacd1 302 bKO	F15-1289-53	F15-1089-1142	F15-1072-1166					
Hacd2 G09 cKO	F5-248-91	23/11/18	2	0			27/06/19	7	Hacd2 G09 cKO	F6-82-100	F248	F4-62-69					
PGK Cre	F7-51-67	26/08/2017??	1?	0			29/12/17	7	Hacd2 A10 cKO	F8-153-170	ND	ND					
PGK Cre	F7-51-74	26/08/2017??	1?	0			30/12/17	10	Hacd2 A10 cKO	F8-153-172	ND	ND					
TEK Cre	N*11	ND	1?	0			17/05/19	8	Hacd2 G09 bKO	F11-161-229	ND	ND					
TEK Cre	N*12	ND	1?	0			18/05/19	9	Hacd2 G09 bKO	F11-161-229	ND	ND					
TEK Cre	N*14	ND	1?	0			17/05/19	3	Hacd2 A10 bKO	F17-436-497	ND	ND					
B6	F135	20-23/07/2016??	2	0			19/02/17	9	Hacd1 Cx40 ERT2	M500783	F99	M80					
Hacd1 302 bKO	F16-1142-1316	05/09/18	2	0			30/06/19	9	Hacd1 302 bKO	F18-1289-53	F15-1089-1142	F15-1072-1166					
DNM2	F17-250-149	20/09/18	2	0			05/07/19	2	B6	M266	F250	F16-1140-1191					
DNM2	F13-1167-141	12/10/18	1	0			07/07/19	7	B6	M265	F12-12-1167	F1-11-9					
Hacd2 A10 Flox	F13-249-351	27/12/18	2	0			11/07/19	6	Hacd2 A10 Flox	F14-361-367	F249	F12-285-302					
Hacd2 G09 cKO	F6-82-94	02/12/18	2	0			15/07/19	3	Hacd2 G09 cKO	F6-82-99	F5-67-82	M236					
Hacd2 A10 Flox	F13-241-335	28/12/18	1	0			17/07/19	7	Hacd2 A10 Flox	F14-361-367	F241	F12-285-303					
Hacd2 G09 Flox	F4-62-66	29/12/17	1	1	0	20/05/2018?	0	29/04/18	9	ND	ND	F3-170-62	M179	0	0		5 morts parmi les 9 sourceaux
Hacd2 G09 Flox	F10-275-295	17/02/19	1	0			27/07/19	6	Hacd2 G09 Flox	F10-275-291	F9-241-275	M260					
Hacd2 A10 Flox	F14-361-369	02/04/19	1	0			11/08/19	4	Hacd2 A10 Flox	F14-351-373	F13-298-361	F13-298-329					
Hacd1 99 cKO	F14-278-293	08/01/19	1	0			12/08/19	9	Hacd1 99 cKO	F14-278-290	F13-1136-278	F13-1135-288					
B6	F174	06/04/17	2	1	0	21/11/2017?	0	11/11/17	1	Hacd1 99 Flox	F11-167-1015	ND	ND	ND	0		
Hacd1 99 cKO HSA Cre ERT2	F10-1609-882 ou F10-1605-882	? Ou 10/12/2016	ND	0			16/06/17	6	Hacd1 99 bKO	F10-809-921	? Ou F1605	F9-755-822					
Hacd2 G09 Flox	F5-160-190 ou F4-70-175	10/01/2017 ou 15/08/2016	ND	0			12/04/17	3	Hacd2 G09 Flox	F4-68-171	F4-71-160 ou ?	M148 ou ?					

B6	F313	03/05/19	1	0				17/08/19	3	Hacd2 A10 Konul	F12-344-353	F283	M265						
Hacd1 302 bKO	F17-1315-61	25/01/19	1	0				25/08/19	6	Hacd1 302 bKO	F17-1316-62	F16-1142-1315	F16-1156-1342						
B6	F157	25/11/16	1	1	0	ND	ND	21/03/17	9	Mesp1 Cre	F6-21-272	F146	M143			ND			
Hacd1 302 bKO	F17-1315-62	25/01/19	1	0				25/08/19	8	Hacd1 302 Bko	F17-1316-62	F16-1142-1315	F16-1156-1342						
Hacd1 302 bKO	F17-1315-60	25/01/19	2	0				25/08/19	8	Hacd1 302 bKO	F18-1331-74	F16-1142-1315	F16-1156-1342						
Hacd1 99 bKO	F15-1212-36	02/02/19	3	0				25/08/19	7	Hacd1 99 bKO	F15-1211-37	F13-1133-1212	F14-1202-1299						Cannibalisme le 17/05/19
Hacd1 99 bKO	F15-1294-29	26/01/19	1	0				26/08/19	3	ND	ND	F14-1202-1294	F13-1112-1185						
B6	F312	03/05/19	1	0				26/08/19	6	Hacd2 A10 Konul	F12-344-353	F283	M265						
Hacd1 99 bKO	F15-1294-27	26/01/19	1	0				08/09/19	3	Hacd1 99 bKO	F15-1294-23	F14-1202-1294	F13-1112-1185						
Hacd1 302 Bko	F14-1236-46	08/02/19	2	0				10/09/19	3	Hacd1 302 bKO	F15-1212-30	F13-1112-1236	F13-1121-1248						
Hacd2 A10 Flox/Flox	F14-336-383	07/05/19	1	0				11/09/19	7	Hacd2 A10 Flox/Flox	F14-361-367	F13-241-336	F13-239-333						
Hacd1 302 bKO	F18-1331-77	09/02/19	1	0				15/09/19	8	Hacd1 302 bKO	F18-1289-53	F17-1232-1331	F16-1156-1343						
Hacd2 A10 cKO/bKO TEK Cre	F12-103-244	ND	1	0				19/09/19	9	Hacd2 A10 cKO/bKO TEK Cre	F18-468-525	ND	ND						
Hacd1 99 bKO	F15-1211-39	03/02/19	2	0				15/09/19	7	Hacd1 302 bKO	F15-1212-30	F13-1133-1211	F14-1202-1299						
Hacd2 A10 Flox	F14-239-377	ND	ND	0				09/08/19	6	Hacd2 A10 Flox	F14-351-373	ND	ND						
Hacd2 A10 Flox	F14-350-364	ND	ND	0				05/07/19	7	Hacd2 A10 Flox	F14-351-373	ND	ND						
Hacd2 A10 Flox	F14-350-365	ND	ND	0				11/11/19	5	Hacd2 A10 Flox	F15-351-410	ND	ND						
Hacd2 A10 Flox	F14-350-365	ND	1	0				29/06/19	4	Hacd2 A10 Flox	F14-351-373	ND	ND						
Hacd2 A10 Flox	F14-361-420	ND	2	0				17/10/19	7	Hacd2 A10 Flox	F15-335-413	ND	ND						
Hacd2 G09 Flox/Flox	F10-275-294	17/02/19	1	0				19/09/19	6	Hacd2 G09 Flox/Flox	F10-276-312	F9-241-275	M260						
Hacd2 A10 Flox	F15-335-415	17/07/19	1	0				28/10/19	6	Hacd2 A10 Flox	F15-351-410	F13-241-335	F14-361-367						
Hacd2 A10 Flox	F14-350-387	19/05/19	1	0				29/10/19	7	Hacd2 A10 Flox	F14-361-367	F13-249-350	F13-239-333						
Hacd2 G09 Flox	F4-70-175	15/08/16	ND	0?				11/02/17	2	Hacd2 G09 Flox	F4-70-172	ND	ND						
Hacd2 A10 Flox	F15-335-414	17/07/19	1	0				29/10/19	10	Hacd2 A10 Flox	F15-351-410	F13-241-335	F14-361-367						
Hacd2 Flox/Flox	F15-364-406	05/07/19	1	0				11/11/19	9	Hacd2 A10 Flox	F14-361-367	F14-350-364	F14-351-373						
Hacd2 G09 Flox	F5-166-189	ND	ND	0				12/04/17	2	Hacd2 G09 Flox	F4-70-172	ND	ND						
Hacd2 G09 Flox	F6-166-228	28/04/2017?	ND	0				29/12/17	6	B6	M211	ND	ND						
Hacd1 302 bKO	F19-59-87	10/05/19	1	0				12/11/19	8	Hacd1 302 bKO	F18-49-126	F17-1315-59	F18-1289-53						
Hacd1 99 bKO	F16-39-126	29/05/19	1	0				12/11/19	3	Hacd1 99 bKO	F16-35-105	F15-1211-39	F14-1251-14						
Hacd2 Flox/Flox	F15-364-404	05/07/19	1	0				12/11/19	4	Hacd2 Flox/Flox	F15-369-392	F14-350-364	F14-351-373						
Hacd1 99 cKO	F11-946-999	10/05/17	1	1	0	ND	0	23/10/17	5	HSA cre ERT2	F1-1620-8	F10-852-946	M133	0	1	ND	ND		
Hacd2 Flox/Flox	F15-365-391	29/06/19	1	0				13/11/19	8	Hacd2 Flox/Flox	F15-351-410	F14-350-365	F14-351-373						

B6	F170	06/04/17	2	0			17/12/2017 ou 10/01/2018	3 ou 5	Hacd1 99 Flox	F11-167- 1019	ND	ND					
----	------	----------	---	---	--	--	--------------------------------	--------	---------------	------------------	----	----	--	--	--	--	--

CARACTÉRISATION ÉPIDÉMIOLOGIQUE, HISTOLOGIQUE ET ÉTIOLOGIQUE D'UNE ENTÉRITE NÉCROSANTE AIGUË CHEZ LA SOURIS DE LABORATOIRE EN LACTATION

AUTEUR : Sylvain LAVOCAT

RÉSUMÉ :

Entre mars 2016 et décembre 2019, plusieurs souris en lactation d'une animalerie de l'École nationale vétérinaire d'Alfort (EnvA) ont été atteintes d'une entérite nécrosante aiguë (ENA) à l'origine d'une mort soudaine sans signe d'appel. Cette affection s'accompagnait systématiquement d'une distension abdominale causée par une dilatation et une nécrose de l'intestin. La littérature fait état de descriptions cliniques et lésionnelles similaires chez la souris en lactation sous différentes appellations : « *ileus and paresis of peristalsis* », « *deficient lactation* », « *fatal acute intestine pseudoobstruction* », « *postpartum ileus* », « *lactation ileus* ». Malgré ces descriptions, l'étiologie de cette maladie est à ce jour inconnue.

Dans le but de caractériser cette maladie, nous avons réalisé une étude épidémiologique grâce à une base de données élaborée à partir des portées obtenues sur cette période. Ensuite, nous avons mené une étude histologique à partir de coupes d'intestins récoltés chez les souris mortes d'ENA et préparés avec une coloration hémalum-éosine-safran. Enfin, nous avons poursuivi l'étude étiologique commencée au laboratoire « Découverte de pathogènes » de l'Institut Pasteur. Grâce à un séquençage de Sanger, cette étude préliminaire a permis d'identifier deux agents viraux présents en quantité importante et responsables d'affections digestives chez d'autres espèces : un astrovirus (AVM) et un norovirus (NVM). La suite du projet consistait à quantifier ces virus par RT-qPCR sur un plus grand nombre d'échantillons. La seconde partie de l'étude étiologique visait à exclure deux agents bactériens évoqués dans la littérature par la mise en culture de *C. perfringens* et par l'amplification de séquences de *C. piliforme* par PCR nichée.

L'étude épidémiologique a déterminé que l'occurrence de l'ENA chez la mère de la souris allaitante était un facteur de risque d'ENA. A l'inverse, l'âge de la femelle, le rang de parité, la taille de la portée n'étaient pas des facteurs de risque et la maladie ne se transmettait probablement pas sexuellement. L'étude histologique a permis de décrire deux profils lésionnels de l'ENA, de proposer une appellation pour cette lésion et d'exclure toute lésion de Clostridium. De plus, les cultures de *C. perfringens* se sont révélées négatives. Néanmoins, des aléas techniques et le manque de temps n'ont pas permis de réaliser la recherche virale par RT-qPCR et la recherche de *C. piliforme* par PCR nichées.

A ce jour, l'origine de l'ENA reste inconnue mais nos données permettent d'avancer avec conviction une hypothèse virale et de préciser les données épidémiologiques de cette affection.

MOTS CLÉS : SOURIS EN LACTATION, ENTERITE NECROSANTE AIGUË, ASTROVIRUS, NOROVIRUS, CLOSTRIDIUM PERFRINGENS, CLOSTRIDIUM PILIFORME.

JURY :

Président : Pr Marc ELOIT

Directrice de thèse : Pr Fanny PILOT-STORCK

Examineur: Dr Edouard REYES-GOMEZ

EPIDEMIOLOGICAL, HISTOLOGICAL AND ETIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF AN ACUTE NECROTIZING ENTERITIS IN LACTATING MICE OF LABORATORY RESEARCH

AUTHOR: Sylvain LAVOCAT

SUMMARY:

From March 2016 to December 2019, several lactating mice suddenly die from an acute necrotizing enteritis in an animal facility of the EnvA. Lactating mice died suddenly without premonitory signs and show abdominal distension with necrotizing and distended small intestine. Previous descriptions reported similar clinical signs and gross lesions called as: ileus and paresis of peristalsis, deficient lactation, fatal acute intestine pseudoobstruction, postpartum ileus, lactation ileus. Despite several scientific papers, the cause of the disease remains unknown.

In order to describe this condition, we realized an epidemiological study thanks to a database built from data obtained from mice of the animal facility. Then, we ran a histological study from intestinal samples using a hematoxylin and eosin stain. At last, we pursued the etiological study started by the Pasteur Institute. Thanks to Sanger sequencing, this preliminary study allowed to identify two viral agents capable of producing intestinal diseases in other species: an astrovirus (AVM) and a norovirus (NVM). The following step aimed at using a RT-qPCR to quantify those viruses on a greater scale. Another part of this study was to rule out two bacterial agents quoted in some research articles: *C. perfringens* by anaerobic culture and *C. piliforme* by nested PCR.

The epidemiological study showed that the appearance of ENA in lactating mice's mother was a risk factor for ENA. By contrast, the age, the size of the litter, the parity of lactating mice were not risk factors and the disease was probably not transmitted sexually. The histological study described two typical lesional patterns and ruled out any hemorrhagic lesion in the affected mucosa. Besides, anaerobic culture for *C. perfringens* was negative. However, technical issues and lack of time did not allow us to perform RT-qPCR for AVM and NVM, and nested PCR for *C. piliforme*.

Up to date, origin of the ENA is still unknown but our data strongly suggest a viral origin for this disease and provide insight on its epidemiological context.

KEYWORDS: LACTATING MICE, ACUTE NECROTIZING ENTERITIS, ASTROVIRUS, NOROVIRUS, *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*, *CLOSTRIDIUM PILIFORME*.

JURY:

Chairperson: Pr Marc ELOIT

Thesis Director: Pr Fanny PILOT-STORCK

Reviewer: Dr Edouard REYES-GOMEZ