



# **Gestion des risques de contamination et leur détection en animalerie axénique**

**Mémoire**

**Maria Lebeuf**

**Maîtrise en microbiologie - avec mémoire**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

# **Gestion des risques de contamination et leur détection en animalerie axénique**

**Mémoire**

**Maria Lebeuf**

Sous la direction de :

Caroline Duchaine, codirectrice de recherche  
Éric Paradis, codirecteur de recherche

# Résumé

L'usage d'animaux axéniques comme modèles a augmenté exponentiellement dans les dernières années en recherche expérimentale. Afin de conserver leur statut axénique, les animaux doivent être contenus dans des isolateurs traditionnels ou des isolateurs au niveau de la cage, incluant la cage scellée à pression positive de Tecniplast : l'Isocage. Cependant, le moyen le plus efficace de confirmer leur statut axénique des animaux reste incertain, particulier pour les isolateurs au niveau de la cage, comportant un plus grand risque de contamination que l'isolateur traditionnel en raison de leur contact plus fréquent avec l'environnement extérieur.

Ce projet de maîtrise a pour buts de gérer le risque de contamination associé à l'Isocage en optimisant la désinfection par immersion et en déterminant l'efficacité des mesures de précautions axéniques, puis finalement de déterminer l'efficacité des mesures de détection à démontrer la présence de contaminants en cages axéniques

Les travaux d'optimisation de la désinfection par immersion a permis de déterminer la charge microbienne résiduelle retrouvée à la surface des Isocages entre deux changements de cage, d'évaluer l'efficacité sporicide de deux désinfectants, et finalement de déterminer le temps optimal de désinfection pour l'immersion des cages axéniques lors d'un changement de cage selon la concentration du désinfectant utilisé. L'efficacité de mesures de précaution axéniques a été confirmée en comparant les flores microbiennes retrouvées à la surface de cages contenues dans des locaux axéniques et non axéniques. L'efficacité des mesures de détection à démontrer la présence de contaminants en Isocage a été déterminée en développant, validant et optimisant trois différentes méthodes, puis en testant *in situ* leur efficacité à détecter des contaminants artificiellement introduits dans des cages axéniques.

Cet ouvrage constitue un apport important au domaine puisqu'il est l'un des premiers à aborder la gestion des risques et l'efficacité des méthodes de détection lors d'utilisation de l'Isocage et du bassin d'immersion annexé à la station de biosécurité avec des animaux axéniques.

# Abstract

The use of axenic animals as models have increased exponentially in recent years in experimental research. In order to maintain their axenic status, animals must be contained in traditional isolators or isolators at the cage level, which includes Tecniplast's sealed positive pressure Isocage. However, the most effective way to confirm animal axenic status remains uncertain, especially for cage-level isolators, which carry a greater risk of contamination than the traditional isolator due to their most frequent contact with outer environment.

This Master's project aims were to manage the risk of contamination associated with Isocage by optimizing disinfection by immersion and determining the effectiveness of axenic precautionary measures; then finally to determine the effectiveness of the detection measures to demonstrate the presence of microbial contaminants in axenic Isocages.

The optimization of disinfection by immersion made it possible to determine the residual microbial load found on the surface of Isocages between two cage changes, to evaluate the sporicidal efficiency of two disinfectants, and finally to determine the optimal disinfection time for the immersion of the axenic cages during a change of cage depending on the concentration of disinfectants used. The effectiveness of axenic precautionary measures has been confirmed by comparing the microbial flora found on the surface of cages contained in axenic and non-axenic rooms. The effectiveness of detection measures to demonstrate the presence of contaminants in Isocage has been determined by developing, validating and optimizing three different methods, then by testing *in situ* their effectiveness to detect contaminants artificially introduced into axenic cages.

This work constitutes an important contribution to the field since it is one of the first to discuss risk management and the effectiveness of detection methods when using Isocage and the immersion basin attached to the biosecurity station with axenic animals.

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des illustrations.....	ix
Liste des formules et équations.....	x
Liste des abréviations, des acronymes et des sigles.....	xi
Remerciements.....	xii
Avant-propos.....	xiv
Introduction.....	1
0.1 : Axénie : Origine et démonstration du concept.....	1
0.2 : Développement des isolateurs et applications.....	3
0.2.1 : Les isolateurs.....	3
0.2.2 : Les isolateurs au niveau de la cage.....	9
0.3 : L'ISOcage et ses infrastructures.....	14
0.3.1 : Station de biosécurité pour Isocage (IBS).....	15
0.3.2 : Désinfectants.....	16
0.4 : Changements de cages et précautions axéniques.....	17
0.4.1 : Équipements de protection individuel (EPI) et local axénique.....	17
0.4.2 : Entrée du matériel dans les infrastructures d'hébergement.....	18
0.5 : Méthode de détection d'une contamination microbienne.....	19
0.5.1 : Méthode par culture.....	21
0.5.2 : Méthode par microscopie.....	24
0.5.3 : Méthodes de biologie moléculaire.....	26
0.5.4 : Autres méthodes.....	28
0.5.5 : Collecte d'échantillons et fréquence d'échantillonnage.....	28
0.6 : Problématiques, hypothèses et objectifs des travaux de recherche.....	31
0.6.1 : Problématiques.....	31
0.6.2 : Hypothèses.....	32
0.6.3 : Objectifs.....	32

Chapitre 1 : Gérer le risque de contamination dans une animalerie axénique. Article - Managing Bacterial Contamination Risk in an Axenic Mice Animal Facility. ....	34
1.1 : Résumé.....	35
1.2 : Abstract.....	36
1.3 : Keywords.....	36
1.4 : Introduction.....	37
1.5 : Materials and methods.....	39
1.5.1 : Animal facility infrastructure and precautions .....	39
1.5.2 : Microbial quantification and biodiversity.....	41
1.5.3 : Disinfection tests using surrogates.....	42
1.5.4 : Determination of log reduction target, disinfectant concentration and soaking time .....	43
1.6 : Results.....	44
1.6.1 : Microbial quantification and biodiversity on axenic and non-axenic cages.....	44
1.6.2 : Determination of required immersion time.....	45
1.7 : Discussion.....	46
1.7.1 : Microbial quantification and biodiversity on axenic and non-axenic cages.....	46
1.7.2 : Disinfection tests.....	47
1.8 : Conclusion .....	49
1.9 : Acknowledgements.....	49
1.10 : References.....	50
1.11 : Tables.....	55
1.12 : Figures.....	57
Chapitre 2 : Déterminer l'efficacité des méthodes à détecter des contaminants microbiens en condition axénique. Article – Contaminants and Where to Find Them : Microbiological Quality Control in Axenic Animal Facilities. ....	59
2.1 Résumé.....	60
2.2 Abstract.....	61
2.3 Keywords .....	61
2.4 : Introduction.....	62
2.5 : Materials and methods.....	65
2.5.1 : Axenic animal facility.....	65
2.5.2 : Cultures .....	66
2.5.3 : Microscopy .....	67
2.5.4 : Molecular biology techniques.....	67

2.5.5 : Testing <i>in situ</i> the methods effectiveness to detect spiked microbial contamination over time.....	68
2.6 : Results.....	70
2.6.1 : Cultures.....	70
2.6.2 : Microscopy.....	71
2.6.3 : Molecular biology techniques.....	71
2.6.4 : Testing <i>in situ</i> the methods effectiveness to detect spiked microbial contamination over time.....	72
2.7 : Discussion.....	74
2.7.1 : Cultures.....	74
2.7.2 : Microscopy method.....	75
2.7.3 : Molecular biology techniques.....	75
2.7.4 : Testing <i>in situ</i> the methods effectiveness to detect spiked microbial contamination over time.....	76
2.8 : Conclusion.....	79
2.9 : Acknowledgements.....	80
2.10 : References.....	80
2.11 : Tables.....	83
2.12 : Figures.....	83
Chapitre 3 : Discussion générale.....	85
Conclusion et perspectives.....	91
Bibliographie.....	94
Annexe A : Illustration de l'appareil axénique de Gustafsson.....	105
Annexe B : Illustration de l'intérieur de l'isolateur de Gustafsson.....	106
Annexe C : Illustration de l'isolateur avec bras télécommandés de Miyakawa.....	107
Annexe D : Illustrations de la hotte bactériologique de transfert et d'un espace de rangement pour cages filtrantes de Kraft.....	108
Annexe E : Hotte de transfert en contre-plaqué de Kraft.....	109
Annexe F : Surface de travail mobile à ventilation de masse filtrée HEPA.....	110
Annexe G : Cage Sentry SPP et le portoir Allentown.....	111
Annexe H : Portoir d'hébergement pour Isocages et IBS.....	112

## Liste des figures

Figure 1 : Schéma du premier appareil axénique de Gustafsson.....	4
Figure 2 : Schéma d'une coupe transversale de l'isolateur large en acier inoxydable de Gustafsson. ....	5
Figure 3 : Schéma d'isolateurs basiques et spécialisés sans germe (Reyniers).....	6
Figure 4 : Schéma de l'unité d'élevage sans germes M-57 (Miyakawa). ....	9
Figure 5 : Sampling and sample treatment for quantification and biodiversity measures ...	57
Figure 6 : Proportion of each identified genus according to room type.....	57
Figure 7 : Survival effect of <i>B. atrophaeus</i> spores and <i>Staphylococcus epidermidis</i> with MB-10 and 10% Virkon over time.....	58
Figure 8 : Proportion of positive samples per culture when non-axenic and accidentally contaminated axenic mice are introduced into sterile cages after two weeks. ....	83
Figure 9 : <i>In situ</i> protocol and results for the three optimized methods.....	84



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Échantillons les plus utilisés dans la littérature pour la recherche de contaminants en animalerie axénique par culture.....	21
Tableau 2 : Milieux de culture les plus utilisés dans la littérature pour la recherche de contaminants en animalerie axénique par culture.....	22
Tableau 3 : Exemple de surveillance de contaminants en isolateur axénique.....	30
Table 4 : Total aerobic and anaerobic microbial diversity on cages from axenic room and probable sources .....	55
Table 5 : Total aerobic and anaerobic microbial diversity on cages from non-axenic room and probable sources .....	56
Table 6 : Soaking time required to reach 6 log reduction of <i>B. atrophaeus</i> spores in all disinfectant solution.....	56
Table 7 : Blind readings of Isocage samples using wet mounts and Gram stain for different mouse types .....	83

## Liste des illustrations

Illustration 1 : Photo d'un isolateur versatile en vinyle transparent. ....	7
Illustration 2 : Photo de cages filtrantes. ....	10
Illustration 3 : Photo de cages à couvercle filtrant contenues dans un portoir. ....	11
Illustration 4 : Photo du Micro-Isolator™ de Sedlacek et Lab Products Inc. ....	12
Illustration 5 : Photos d'un ISOcage P de Tecniplast. ....	14

## Liste des formules et équations

Formula 1 : Log Factor Reduction .....	44
Equation 1 : Determination of the limit of blank for the molecular biology method .....	68
Equation 2 : Determination of the limit of detection for the molecular biology method .....	68
Equation 3 : Determination of the percentage of positive samples for the culture method used for the <i>in situ</i> protocol .....	69

## Liste des abréviations, des acronymes et des sigles

A	Axenic mice ou souris axéniques
AC	Accidentally contaminated axenic mice ou souris axéniques accidentellement contaminées
ADN ou DNA	Acide désoxyribonucléique ou desoxyribonucleic acid
ARN ou RNA	Acide ribonucléique ou ribonucleic acid
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique ou ribosomal ribonucleic acid
BA	<i>Bacillus atrophaeus</i>
BHI	Infusion cœur-cerveille ou brain heart infusion
BHIA	Infusion cœur-cerveille agar ou brain heart infusion agar
CPAUL	Comité de protection des animaux de l'Université Laval
CCPA	Conseil canadien de protection des animaux
CS	<i>Clostridium sporogenes</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DO ou OD	Densité optique ou optical density
É. -U. ou USA	États-Unis d'Amérique ou United states of America
EqGen/g	Equivalent genomes per gram ou equivalent génomes par grammes
ELISA	Dosage d'immunoabsorption par enzyme lié ou enzyme-linked immunosorbent assay
FISH	Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence ou fluorescent <i>in situ</i> hybridation
HEPA	Filtre à air à haute intensité ou high-efficiency particulate air
IBS	Station de biosécurité pour Isocage ou Isocage biosafety station
LR	<i>Lactobacillus reuteri</i>
LOB	Limit of blank ou limite des blancs
LOD	Limit of detection ou limite de detection
NA	Non-axenic mice ou souris non-axéniques
PCR	Réaction de polymérase en chaine ou polymerase chain reaction
Ppm	Partie par million ou parts per million
PVC	Polychlorure de vinyle ou polyvinyl chloride
qPCR	Réaction de polymérase en chaine quantitative ou en temps réel ou quantitative polymerase chain reaction
SAH	Acide léger à l'hypochlorite de sodium ou soft acid sodium hypochlorite
SPF	Sans pathogènes spécifiques ou specific-pathogen-free
UFC ou CFU	Unité formatrice de colonie ou colony-forming unit

## Remerciements

Mon premier merci est dédié à Caroline Duchaine, directrice de recherche exceptionnelle, à l'écoute, motivée et d'un sens de l'humour n'ayant pas son égal. Merci infiniment d'avoir cru en moi, ainsi que pour toutes les opportunités et l'autonomie que tu m'as octroyées dès le départ pour dans ton équipe. Je n'aurais certainement pas le bagage que j'ai aujourd'hui, ni l'éblouissant avenir qui m'attend sans toi. Merci vraiment!

Mon deuxième merci est pour Nathalie Turgeon, je n'aurais pu demander meilleure mentor, la meilleure qui soit. Elle est le parfait exemple de persévérance, de bonne humeur et de savoir-faire. Merci pour tous tes trucs de pro qui m'ont fait grandir autant que si j'étais debout sur une pile infinie de *chaises*, et également pour tes brins de jasettes aux moments où j'en avais le plus besoin. Tu auras toujours une place spéciale dans mon cœur <3.

Mon troisième merci est pour le personnel de l'animalerie du centre de recherche, Justin Robillard, Joanie Drolet, mais plus particulièrement Cynthia Faubert et Alexandre Pleau pour leur coopération, leur bon vivant et leur dynamisme tout au long de ma maîtrise. Cette aventure n'aurait pas été aussi palpitante sans votre présence et votre efficacité ! Gracioosss Amigoss!

Mon quatrième merci est pour Éric Paradis, mon codirecteur de maîtrise. Merci d'avoir cru en mes capacités et d'avoir défendu mes intérêts dès le départ. Merci aussi de m'avoir partagé ta vision et ton savoir-faire, et d'avoir continué à m'appuyer jusqu'à la fin de ma maîtrise.

Mon cinquième merci est pour André Marette et Roger C. Lévesque qui ont fait partie de mon comité d'encadrement. Merci pour vos judicieux conseils, pour votre intérêt palpable, ainsi que vos idées lors de nos rencontres. Ce fut fascinant de vous voir à l'œuvre et d'apprendre de par votre expérience.

Mon sixième merci est pour la famille du laboratoire Duchaine. Merci à Valérie, Marc, Jodelle, Marie-Ève, Jon, Karine, Joanie, Magali-Wen, Amélia, Hamzaaaa et Vinceeeent d'avoir partagé avec moi ces deux dernières années. Merci pour les fous rires, votre écoute et vos péripéties.

Mon septième merci, et non je ne vous avais pas oublié, comment vous oublier? Nathan et Pamela, mes prefs, je suis tellement redevable à la vie de vous avoir mis sur mon chemin et de vous avoir eus à mes côtés dès notre premier été de stage. J'ai assez hâte que la covid soit finie pour vous revoir et qu'on puisse sortir tous ensemble fêter comme il se doit nos fins de maîtrise. Je vous aime.

Mon huitième merci est pour mes plus grands fans, soit ma famille. Tout d'abord mes parents, merci de m'avoir soutenu dans ce long processus, de m'avoir nourri lors de mes visites, et de m'avoir dépannée dans la mesure de votre possible dans les périodes moins prospères. Je vous serai éternellement redevable de m'avoir tant donné. Je vous aime fort. Merci également à mes frères pour votre compagnie, votre bière et votre hospitalité quand j'avais besoin d'une pause de cerveau ou simplement quand je m'ennuyais de vous. Thanks bros.

Mon neuvième et dernier merci est pour Edouard. Merci d'être à mes côtés, de me motiver et de juste exister. Je suis heureuse que tu fasses partie de mon quotidien et que tu m'aies encouragée tout au long de mon parcours universitaire à me dépasser. Je nous souhaite encore plein de belles années d'amour et de complicité. Je t'aime fort ☺<3.

## Avant-propos

Cet ouvrage est composé de cinq parties. La première constitue une revue de la littérature sur l'origine de l'axénie, son utilisation en recherche sur les animaux, la démonstration du concept, le développement des isolateurs et les applications apparentées, les infrastructures associées à l'Isocage, les mesures de précautions axéniques et finalement les méthodes de détection d'une contamination. Le Chapitre 1, présenté sous forme d'article scientifique, présente la méthodologie et les résultats associés à la gestion des risques en animalerie axénique. Le Chapitre 2 est également présenté sous forme d'article scientifique, mais se penche plutôt sur la détermination de l'efficacité des méthodes utilisées à détecter des contaminants en conditions axéniques. La quatrième partie consiste en une discussion des résultats obtenus aux Chapitres 1 et 2, jouant le rôle de charnière entre ceux-ci et la littérature. Finalement, le dernier chapitre présente les conclusions et perspectives du projet de maîtrise.

«Managing Bacterial Contamination Risk in an Axenic Mice Animal Facility» est le premier article, il compose le Chapitre 1. Il a été accepté le 23 mars 2021 dans la revue *Canadian Journal of Microbiology*. «Contaminants and Where to Find Them : Microbiological Quality Control in Axenic Animal Facilities» est le second article et a été soumis sous cette forme le 10 décembre 2020 dans la revue *Gut Microbes* et il compose le Chapitre 2. Puisque la publication n'a pas été acceptée sous cette forme, il sera soumis après édition dans un autre journal en temps opportun. J'ai effectué les expérimentations et écrit la première ébauche des deux articles scientifiques à titre de première auteure. Nathalie Turgeon a contribué à la conception des deux études et à la correction des manuscrits. Cynthia Faubert a contribué à la récupération des échantillons pour les deux projets, ainsi qu'à la conception et à la révision des manuscrits. Alexandre Pleau a également contribué à la récupération des échantillons, à la conception et la révision d'article, mais pour le second article uniquement. Justin Robillard a quant à lui contribué à la révision des deux articles. Pr André Marette a révisé le deuxième article et commenté les travaux à travers sa participation à mon comité aviseur. Éric Paradis a participé à la conception des expériences et à la révision des articles. Finalement, la Pre Caroline Duchaine a participé à la conception des deux expérimentations, à la supervision des travaux, ainsi qu'à la correction finale des deux articles.

Les articles insérés dans ce mémoire varient des versions soumises afin de satisfaire aux exigences de mise en page du présent document. Les numérotations des tableaux et figures ont été modifiées ainsi que le style de leur bibliographie. Chaque section d'article a été numérotée afin de concorder avec l'ordre numérique présentée dans la table des matières du présent ouvrage.

# Introduction

## 0.1 : Axénie : Origine et démonstration du concept

Le concept de vie animale sans microbes, mieux connu aujourd'hui sous le nom d'axénie, qualifie un être vivant et étant élevé en totale absence de bactéries, moisissures, levures, virus, protistes, parasites ou toute autre forme de vie reconnaissable à l'intérieur et à l'extérieur de son corps, ainsi que dans son environnement (Wagner, 1959). Il s'agit d'un concept ayant énormément évolué au fil des années; en raison des capacités d'analyses y étant associées, des découvertes diverses quant aux méthodes de détection de microorganismes et également en raison de l'évolution des infrastructures d'hébergements axéniques sur le marché. Le concept même de l'axénie se complexifie à mesure que les capacités de détection de formes de vie se développent.

C'est en 1885 que Louis Pasteur aborda pour la première fois la possibilité d'une vie animale en l'absence de microorganismes dans ses comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des sciences (Pasteur, 1885a). En effet, son collègue Émile Duclaux avait émis une note quant à la germination de fèves et de pois dans un sol riche en composés organiques, mais ne contenant pas d'êtres microscopiques (Pasteur, 1885b); réflexion à laquelle Pasteur émit l'hypothèse qu'une vie sans microorganismes provenant de l'alimentation, donc colonisant le tube digestif, serait, selon ses connaissances du moment, impossible. Afin de le démontrer, il suggéra d'utiliser des œufs fécondés de poules dont la surface externe serait nettoyée afin d'éliminer toutes traces de poussières vivantes avant l'éclosion; puis les œufs seraient disposés dans un espace quelconque sans germes ayant un renouvellement d'air «pur» de l'extérieur. Par la suite, les jeunes poulets seraient nourris avec des aliments «purs», donc privés artificiellement et complètement de microbes communs. Cependant, malgré le grand intérêt qu'il portait à cette expérience, la complexité et le développement de l'expérience, ainsi que le manque de temps furent d'une ampleur assez grande afin de ne pas permettre sa réalisation (Pasteur, 1885a).



Ce n'est que dans la décennie suivante, en 1897, qu'il put être démontré que la vie et la digestion en l'absence de microorganismes étaient chose possible. C'est en faisant naître par césarienne des cobayes, et non pas des poulets comme suggéré par Pasteur pour des raisons externes, et en les plaçant immédiatement dans un appareil d'isolement de leur confection que Nuttall et Thierfelder purent obtenir des cobayes axéniques. Ceux-ci furent gardés dans un environnement stérile ventilé à l'air «propre» et conditionné à température corporelle et furent alimentés exclusivement avec de la nourriture végétale et du lait stérilisés pendant 8 jours. Par la suite, la stérilité microbiologique des animaux fut démontrée par l'absence de microorganismes en observant au microscope le contenu intestinal et les organes des animaux (échantillon colorés ou non); ainsi qu'en l'absence de croissance dans une multitude de tubes de cultures différents où étaient ensemencés la nourriture, le lait et les excréments récoltés tout au long du protocole (Rosenthal, 1896). C'est entre autres lors de cette expérience qu'il put être démontré que les bactéries étaient nécessaires afin de digérer la cellulose alimentaire (Nuttall George and Thierfelder, 1897). C'est en raison de contraintes techniques dont l'interruption du service jour et nuit que le protocole ne put durer plus longtemps. En effet, les cobayes devaient être nourris toutes les deux heures, leurs fèces devaient être retirées, la ventilation contrôlée, l'appareil surveillé en permanence (Rosenthal, 1896). Finalement, malgré quelques essais non concluants portant sur l'obtention de poussins axéniques selon la méthode de Pasteur présentée précédemment, Nuttall et Thierfelder, convaincus que la coquille des œufs, même lavée méticuleusement quelques heures avant l'éclosion des poussins avec des produits corrosifs et de l'acide hypochloridrique, était responsable de leur contamination. En effet, après l'observation de bactéries dans l'intérieur de la coquille d'œuf, les deux jeunes hommes ont alors conclu qu'avant et lors de la formation de la coquille dans l'oviducte de la poule, lui-même colonisé, permettait aux bactéries de s'infiltrer à l'intérieur de la coquille. Cette conclusion et la diplomation de Nuttall et Thierfelder annonçant ne pas vouloir poursuivre les travaux sur l'obtention de poussins axéniques fut donc à l'origine d'un désintéressement de la communauté vis-à-vis l'obtention de poussins pour les quelques dizaines d'années suivant les investigations (Lockyer, 1897).

Par la suite, plusieurs expérimentations furent entreprises graduellement dans les décennies suivantes dans l'espoir d'obtenir des volailles axéniques. Ce n'est qu'en 1912 que cet objectif fut atteint en raison, entre autres, des développements sur les diètes et des

connaissances sur la nutrition du moment, ainsi qu'au développement des isolateurs et la mise au point des techniques efficaces de stérilisation des coquilles d'œufs permettant l'obtention de volailles axéniques et démontrant que les poussins étaient gardés stériles à l'intérieur de l'œuf contrairement à ce qui avait été précédemment conclut par Nuttall et Thierfelder. En effet, il s'avéra que la diète présentée au poussin était difficilement assimilable par son organisme ou perdait son apport nutritif pendant la stérilisation, ne permettant de garder en vie les poussins que quelques jours. Finalement, les technologies d'isolateurs n'étant pas extrêmement développée, les rares laboratoires en possédant les avaient construits eux-mêmes selon le meilleur de leur connaissance et la plupart d'entre-eux étaient trop petits pour d'héberger plus de deux animaux (Schoeb and Orcutt, 2017).

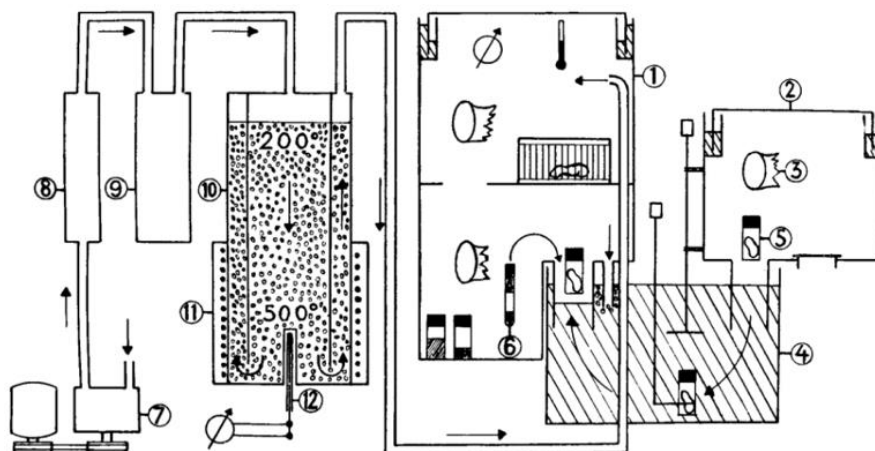
## **0.2 : Développement des isolateurs et applications**

Le développement des isolateurs utilisés de nos jours est principalement attribuable à trois différents groupes d'individus ayant œuvré entre 1930 et 1950, soit Gustafsson en Suède; Reyniers, Texler et Pleasant aux États-Unis d'Amérique (É. -U.) et Miyakawa au Japon, tandis que celui des isolateurs au niveau de la cage est plutôt associé aux travaux de Kraft et Sedlack, tous deux également des É. -U. (Schoeb and Orcutt, 2017).

### **0.2.1 : Les isolateurs**

Tout d'abord, à l'Université de Lund en Suède, bien que les recherches sur des animaux axéniques furent entreprises par Gösta Glimstedt à la fin des années 1920, c'est plutôt son étudiant Bengt Gustafsson qui développa les technologies d'isolateurs dans les années 1940 (Gustafsson, 1946; Lindsey and Baker, 2006). Gustafsson fit progresser tout particulièrement les infrastructures d'hébergement en ayant l'idée d'annexer un «réservoir de trempage» contenant du germicide à deux chambres différentes (Gustafsson, 1946). Tel qu'illustré à la Figure 1 et à l'[Annexe A](#), il annexa une chambre cylindrique d'opération (pour la redérivation embryonnaire) audit «réservoir de trempage» dans lequel transiteraient les rats nouveau-

nés, ainsi qu'une chambre d'hébergement tempérée pouvant contenir deux animaux (Gustafsson, 1946), laquelle était alimentée en air stérilisé et contenait des biberons de lait de vache stérilisé supplémenté (Gustafsson, 1948). Afin d'évaluer l'efficacité de son



appareil, des rats nés dans celui-ci furent hébergés et conservés stériles pendant 28 jours avec succès. L'expérience dut prendre fin, car la chambre d'isolement était devenue trop étroite afin d'héberger les rats plus longtemps (Gustafsson, 1948).

Figure 1 : Schéma du premier appareil axénique de Gustafsson.

1, cage d'élevage; 2, cage d'opération; 3, gants; 4, réservoir de trempage; 5, contenant en route pour la chambre d'élevage; 6, tube test pour le contrôle de la stérilité; 7, compresseur à air; 8, filtreur à air et à huile; 9, humidificateur; 10, arrangement pour stérilisation de l'air; 11, élément électrique; 12, thermorégulateur automatique. (Figure tirée de Gustafsson, 1946)

Ainsi, deux autres isolateurs ayant un fonctionnement identique, mais de dimensions différentes furent développés par Gustafsson dans son article publié en 1959. Le format compact, facilement transportable et pouvant contenir 10 rats, ainsi que le grand format, pouvant héberger jusqu'à 30 rats, étaient disponibles. Tel qu'illustré à la Figure 2, il s'agissait d'un isolateur rectangulaire, composé d'acier inoxydable, avec des joints de caoutchouc et une paire de gants de chaque côté de l'appareil. Le dessus entier de l'isolateur était équipé d'une fenêtre en verre épais servant de couvercle (voir [Annexe B](#)), mais également de port d'entrée pour le matériel préexpérimental. Ce type d'isolateur était complètement autoclavable, bien que certaines mesures durent être prises afin d'éviter que la vitre du dessus soit endommagée lors de l'autoclavage (Gustafsson, 1959).

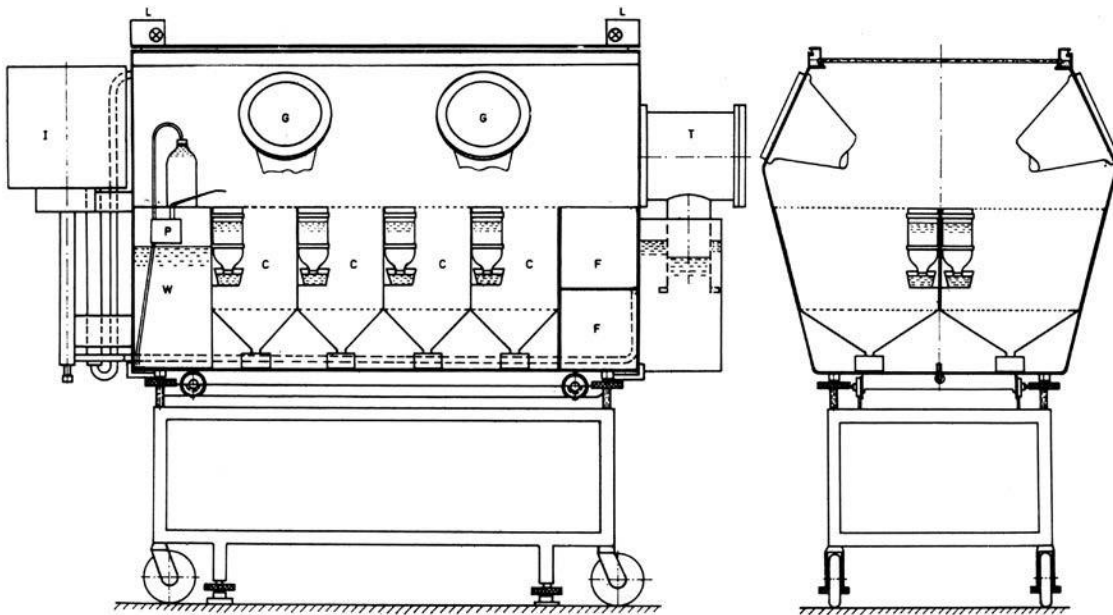


Figure 2 : Schéma d'une coupe transversale de l'isolateur large en acier inoxydable de Gustafsson.

Ce modèle possède une capacité de 20 à 30 rats. L, lumières; I, stérilisateur d'air; W, réservoir à eau; P, pompe à eau; C, cage; G ports à gants; F, contenant à nourriture; T, Autoclave à nourriture et unité de transfert. (Figure tirée de Gustafsson, 1959)

Pour ce qui est des développements des isolateurs aux États-Unis d'Amérique, c'est à l'Université de Notre-Dame dans l'Indiana que James Arthur Reyniers, voulant mieux comprendre l'effet des bactéries sur leur hôte, entrepris d'obtenir des animaux axéniques en se penchant plus particulièrement sur le moyen de s'assurer qu'aucune contamination croisée ne se produirait lors de l'étude des bactéries associées à un hôte (Schoeb and Orcutt, 2017). Il développa donc avec son équipe dans les années 1960 un programme qui deviendrait un leader central dans la recherche axénique en développant entre autres les contenants hermétiques et les méthodes de filtration de l'air (Reyniers, 1959), des techniques non dégradantes de stérilisation de la nourriture (Mickelsen, 1962; Reddy et al., 1968), des procédures visant à détecter et prévenir des fuites et contaminations (Reyniers, 1943; Reyniers, 1957), ainsi qu'en développant des méthodes de stérilisation de la surface des œufs de volailles (Pleasant, 1965) et des techniques pratiques de césariennes (Pleasant, 1959). Cependant, l'un des exploits les plus notables de Reyniers consiste au développement d'un système d'isolateur en acier inoxydable (Figure 3) pouvant être annexé à plusieurs chambres

ainsi qu'à un panneau de contrôle, permettant alors l'élevage des animaux, leur transfert, leur examen et la possibilité d'entreprendre diverses chirurgies (Reyniers, 1959).

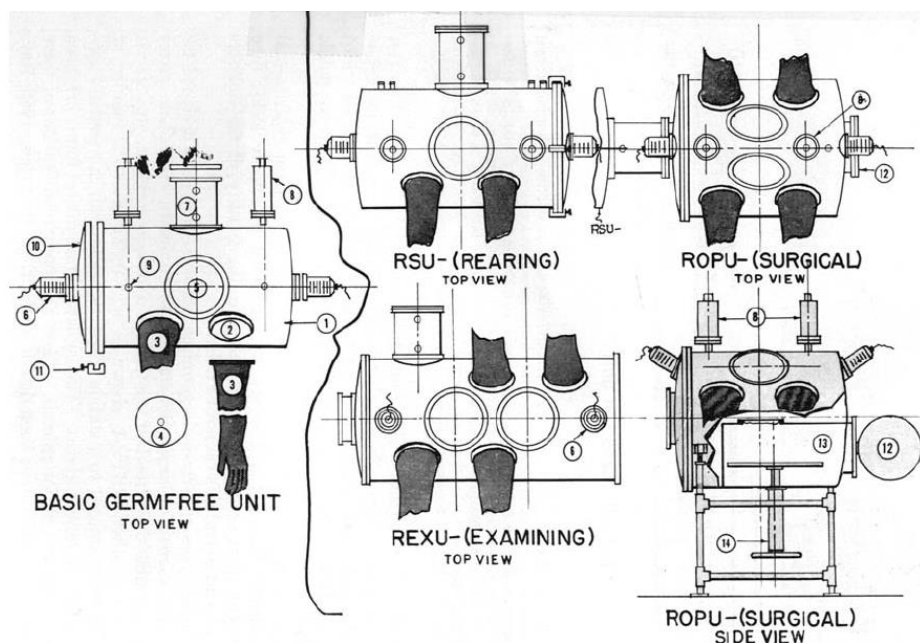


Figure 3 : Schéma d'isolateurs basiques et spécialisés sans germe (Reyniers).

Isolateur de base: (1) coque; (2) anneau pour fixer les gants à l'isolateur; (3) gants en caoutchouc (4) couvercles pour fermer les anneaux de gants pendant la stérilisation (ces couvercles sont équipés d'une valve pour réguler la pression dans les gants); (5) fenêtre, en verre Pyrex; (6) lampes extérieures équipées d'un ventilateur de ventilation et détachables de la fenêtre lumineuse; (7) serrure d'alimentation à double paroi équipée de 2 portes ouvrantes; (8) filtres à air (des pièges peuvent remplacer la forge); (9) ouvertures pour les filtres; (10) porte d'extrémité pour la fermeture de l'isolateur; et (11) pinces en C pour attacher la porte d'extrémité, isolateurs spécialisés: isolateur d'élevage RSU; isolateur à usage général; isolateur d'examen REXU destiné principalement à des travaux expérimentaux nécessitant 2 opérateurs et à combiner avec d'autres isolateurs sans germes pour contrôler un système; et Isolateur chirurgical ROPU, destiné principalement aux césariotomies; (12) porte à ouverture rapide fermant le compartiment des animaux sur ROPU-isolateur chirurgical; (13) compartiment pour animaux fermé de l'intérieur de l'isolateur par une feuille de cellophane; (14) mécanisme de mise en contact des femelles gravides avec la barrière de cellophane. (Figure tirée de Reyniers, 1959)

Ce fut d'ailleurs cet isolateur qui fut le premier construit et commercialisé afin d'être revendu dans d'autres laboratoires à travers le monde (Schoeb and Orcutt, 2017). Cependant, sa fabrication étant assez dispendieuse en raison, entre autres, des nombreuses composantes métalliques complexes. Le visage de cet isolateur fut la cible de changements radicaux lorsque le collègue et successeur de Reyniers, Philip C. Texler, développa le concept des

isolateurs construits avec du vinyle transparent tel qu'illustré à l'illustration 1 (Trexler, 1959; Trexler and Barry, 1958; Trexler and Reynolds, 1957). L'utilisation de ce type de matériel octroyait de grands avantages, dont une stérilisation chimique liquide ou gazeuse plutôt que par autoclavage, une meilleure vision de l'intérieur de l'isolateur, un assemblage facile pour différents usages, ainsi qu'un prix de construction beaucoup plus faible que pour l'isolateur de Reyniers (Trexler and Barry, 1958; Trexler and Reynolds, 1957).



Illustration 1 : Photo d'un isolateur versatile en vinyle transparent.

Il peut être à pression positive ou négative. L'entrée d'air et le verrou stérile sont situés à gauche de l'isolateur. (Illustration tirée de Trexler and Reynolds, 1957)

En date de 1962, plus de 40 laboratoires de recherche avaient adopté l'isolateur de Trexler (Trexler, 1999). C'est d'ailleurs ce type d'isolateur qui est l'ancêtre le plus proche des isolateurs modernes axéniques, mais également des infrastructures d'isolement utilisées aujourd'hui dans les hôpitaux tels les isolateurs pour nouveau-nés prématurés et ceux pour immunodéprimés, pour n'en nommer que quelques-uns (Kirk, 2012). Autrement, la compagnie *Charles-Rivers Breeding Laboratories*, au Massachusetts, fut un autre joueur déterminant dans la mise au point d'isolateur en matériaux transparent en faisant équipe avec une entreprise de plastique local afin de développer ses isolateurs au milieu des années 1990. Ceux-ci utilisant du propylène blanc comme matériel primaire et entre autres du propylchlorure de vinyle (PVC) permettent de commercialiser plusieurs modèles et tailles d'isolateurs, utilisés encore à ce jour dans les laboratoires de recherche.

Outre la mise au point des isolateurs, l'Université de Notre-Dame a également joué un rôle charnière dans le développement à grande échelle des animaux axéniques en développant les premières colonies de reproduction de rats et souris avec l'aide non négligeable de Julian Pleasants, ayant joué un rôle clé dans le développement des diètes axéniques (Schoeb and Orcutt, 2017). En date de 1954, la plateforme de reproduction avait produit plus de 300 descendants de rats axéniques (Pleasants, 1965), tandis que quatre ans plus tard, en 1958, quatorze générations de rats, onze de souris SWISS et huit de souris C3H avaient vu le jour et permis de fournir en modèles de nombreux établissements axéniques à travers le monde (Reyniers, 1958; Schoeb and Orcutt, 2017). Malheureusement, suite au départ de Reyniers en 1959 et Texler en 1962 pour d'autres centres de recherche, puis l'arrivée de Morris Pollard, délaissant graduellement les recherches axéniques pour la cancérologie, le département issu de Reyniers finit par disparaître avec le temps (Schoeb and Orcutt, 2017).

Pour ce qui est des développements effectués au Japon, cherchant eux aussi des réponses quant au rôle des bactéries dans l'organisme; bien que certains acteurs aient effectué des recherches sur des poussins et cobayes axéniques à l'Université Chiba, et à l'Université de Kyoto avec des isolateurs très similaires à ceux utilisés aux É.-U.; c'est plutôt à l'Université Nagoya que les travaux les plus notables sur l'élaboration des isolateurs ont pris place (Schoeb and Orcutt, 2017). À cet effet, Masazumi Miyakawa, ayant débuté ses expériences sur des cobayes en 1946, est à l'origine du développement des isolateurs dans lesquels les manipulations sont réalisées à l'aide de bras mécaniques télécommandés (Miyakawa, 1959). Tel qu'illustré à la Figure 4 et à l'[Annexe C](#), le contrôle des bras mécaniques s'effectue à l'extérieur de l'isolateur, tandis que le matériel entrant et sortant doit transiter par un système d'autoclavage intégré à l'isolateur.

Finalement, il a été mentionné que depuis les 50 dernières années, les principaux composants de la construction des isolateurs traditionnels n'ont pas beaucoup évolué et comprennent une chambre d'isolement, un système de port, un filtre d'entrée et de sortie d'air, un ventilateur qui maintient la pression positive en poussant l'air dans la chambre de l'isolateur et finalement des bras gants (Basic and Bleich, 2019).

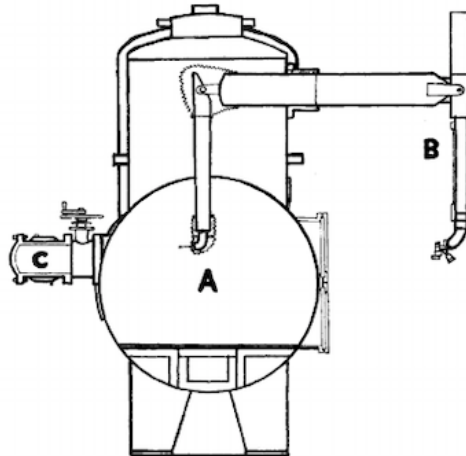


Figure 4 : Schéma de l'unité d'élevage sans germes M-57 (Miyakawa). A, chambre d'élevage sans germes; B, appareil télécommandé; C, appareil de prise de nourriture. (Figure tirée de Miyakawa, 1959)

### 0.2.2 : Les isolateurs au niveau de la cage

Finale­ment, des derniers grands acteurs dans le développement et l'élaboration des isolateurs fait partie Lisbeth Kraft ayant conduit ses recherches aux É. -U (Schoeb and Orcutt, 2017; Suckow and Baker, 2020). C'est en 1958, en cherchant des mesures pour contrôler la propagation dans l'air du virus de la diarrhée épidémique des souris infantiles (EDIM), que Kraft développa le premier type d'isolateur sous forme de cage filtrée. La cage, illustrée à l'illustration 2, fut formée d'une partie principale de forme cylindrique, constituée d'un treillis métallique galvanisé possédant 15 carrés par pouce. Au-dessus du cylindre se trouva un couvercle plat, bien ajusté et également galvanisé, possédant une ouverture permettant d'introduire une bouteille d'eau. Les dimensions de la cage furent de 5 ½ pouces de hauteur par 7 pouces de diamètre, pour une surface au sol de 38 pouces carrés. C'est grâce à du matériel isolant en fibre de verre Corning (« Aerocor » PF 105) inséré dans le treillis métallique que les animaux à l'intérieur de la cage ne furent exposés qu'à de l'air filtré. Les cages contenant les animaux furent entreposées sur des grilles de rangement le temps de l'expérience ([Annexe D](#)) et purent être disposées assez près les unes des autres sans qu'il n'y ait de contamination croisée par le virus de l'EDIM entre les cages contenant des animaux contaminés et des témoins (Kraft, 1958).



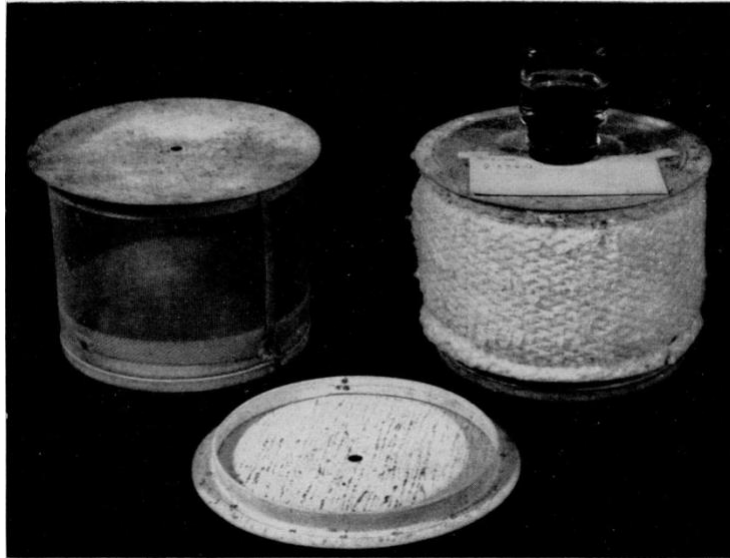


Illustration 2 : Photo de cages filtrantes.

La cage de gauche est présentée sans le matériel filtrant. La cage de droite possède le matériel filtrant ainsi qu'une bouteille d'eau dont le large bouchon l'empêche de basculer. Le couvercle est présenté au premier plan. (Illustration tirée de Kraft, 1958)

Afin de manipuler les animaux à l'extérieur de leurs cages filtrantes, une hotte bactériologique de transfert fut développée par Kraft ([Annexe D](#)). La hotte fut composée de plastique Cheminert et comportant un port d'entrée, ainsi que d'un port de sortie, ces deux derniers éléments contenant des lumières ultraviolettes. L'air entrant dans la hotte, dont l'environnement interne est gardé à pression négative, fut filtré par un filtre en fibre de verre, puis l'air sortant traité par un filtre d'évacuation permanent (Kraft, 1958). Quelques années plus tard, en 1964, Kraft présenta un nouveau design de cage à «couvercle filtrant» de forme rectangulaire dont le couvercle comprenait également de la fibre de verre comme matériel filtrant (Illustration 3). Une hotte de transfert en contreplaqué pour le changement des couvercles filtrants fut également présentée par Kraft, dont la partie supérieure de sa façade avant fut composée d'une vitre inclinée et la partie inférieure ouverte ([Annexe E](#)) (Kraft et al., 1964). Dans les années suivant la parution des cages de Kraft, d'autres modèles similaires firent leur apparition, dont la plupart proposaient des variations quant à la composition des matériaux du couvercle ou bien de leur arrangement (Flynn, 1968; Poiley, 1967; Schneider and Collins, 1966; Simmons et al., 1967). Cependant, tous partageaient l'inconvénient que le matériel de filtration se délogeait facilement et/ou se déformait pendant le lavage ou la

stérilisation, ce qui diminuait grandement la ventilation à l'intérieur des cages (Lipman, 1999).



Illustration 3 : Photo de cages à couvercle filtrant contenues dans un portoir.  
Un portoir peut contenir jusqu'à cinq cages filtrantes par tablette. (Illustration tirée de Kraft, 1964)

C'est Robert Sedlacek, du *Massachusetts General Hospital* aux É.-U., en charge de la surveillance d'une grande colonie de souris gnotobiotiques, animaux nés axéniques et colonisés avec un microorganisme ou une flore microbienne connue, utilisées en recherche sur la radiobiologie qui, face à des préoccupations économiques pour le soutien des animaux dans des isolateurs, raffina avec ses collègues l'un des d'isolateur le plus utilisés de nos jours (Lipman, 1999; Schoeb and Orcutt, 2017). Il fut en effet le premier à utiliser des filtres en fibres de polyester rigides afin de les mouler et les lier par filage à un couvercle transparent en plastique (Hessler, 1999; Sedlacek and Mason, 1977). Il combina l'utilisation de ce type de cage à l'utilisation d'une surface de travail mobile contenant un flux d'air laminaire équipée d'un filtre à particules à haut débit, à utiliser lors de toutes manipulations nécessitant l'ouverture des cages afin de fournir un environnement stérile et ainsi maintenir la flore existante définie des animaux gnotobiotiques, donc non altérés par les microorganismes à l'extérieur des cages (Sedlacek and Mason, 1977). Peu de temps après, en 1982, le Micro-

Isolator™ (Illustration 4), inventé par Sedlacek et la compagnie américaine *Lab Products Inc.* (Seaford, DE, É.-U.), devint la première cage de micro-isolation commercialisée. Celle-ci fut vendue avec ce qui fut considéré comme partie intégrante d'un système de barrière au niveau de la cage : soit la surface de travail mobile équipée de filtres à air à haute intensité (HEPA, [Annexe F](#)) (Hessler, 1999).

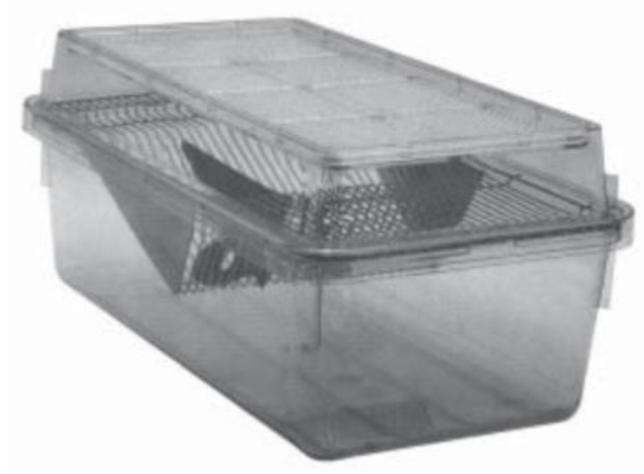


Illustration 4 : Photo du Micro-Isolator™ de Sedlacek et Lab Products Inc. Il s'agit d'une cage à couvercle statique en thermoplastique transparent dont la partie supérieure contient des matériaux filtrants. (Illustration tirée de Hessler, 1999)

En parallèle au développement des cages de Sedlacek, diverses technologies d'hébergement associées aux isolateurs au niveau de la cage afin de maintenir l'axénie de rongeurs de laboratoire furent été développées et confirmées pour l'usage axénique. Ces technologies incluent l'usage d'une unité à flux d'air laminaire, permettant de créer un «mur d'air» vertical entre l'intérieur d'une hotte et de la pièce qui la contient, empêchant ainsi les microorganismes aéroportés d'y pénétrer et contaminer les cages ouvertes (van der Waaij and Andreas, 1971). Il a d'ailleurs été démontré quelques années plus tard que l'utilisation d'un flux d'air vertical dans une hotte de biosécurité pouvait permettre de conserver l'axénie de souris dans des cages ouvertes à six pouces du flux d'air pour une durée allant jusqu'à 49 minutes (McGarrity and Coriell, 1976).

Malgré les importants avantages de ces systèmes de cages ventilées, incluant la diminution de la propagation de microorganismes entre les cages, la diminution de la charge d'allergène animaux dans les pièces d'hébergement et la possibilité de barrière au niveau de la cage, ce type de système comporte certains défauts dont le fait de compromettre l'environnement des animaux (Hessler, 1999). En effet, de nombreuses études ont démontré qu'à l'intérieur de cages de ce type, la température, l'humidité et l'ammoniac furent retrouvés à des concentrations beaucoup plus grandes que dans la pièce qui les contenaient (Flynn, 1968; Hirsjärvi and Väliäho, 1987; Murakami, 1971; Raynor et al., 1983). D'autres auteurs notèrent également un niveau de dioxyde de carbone supérieur, surtout en présence d'un filtre dans le couvercle (Corning and Lipman, 1991; Lipman et al., 1987; Serrano, 1971). C'est donc dans une optique d'amélioration générale du microenvironnement des cages filtrées, mais aussi de contrôle de transmission de maladie entre les cages, que Edwin P. Les développa les cages à micro-isolation à pression positive, lesquelles impliquent un système de ventilation soufflant au travers du filtre de chaque cage individuelle (Hessler, 1999). À la fin des années 1990, ce type de cage était de plus en plus utilisée, en raison entre autres des preuves démontrant l'efficacité de barrière au niveau de la cage (Lipman et al., 1993), mais surtout parce que ce type de ventilation permettait une amélioration de l'environnement de la cage au niveau des niveaux d'ammoniac, de dioxyde de carbone et d'humidité (Corning and Lipman, 1992; Huerkamp and Lehner, 1994; Keller et al., 1983; Reeb et al., 1998; Wu et al., 1985). C'est également en raison du maintien à plus long terme dudit microenvironnement, lequel permettant des changements de cages moins fréquents (deux fois par semaine minimum à plus d'une semaine entre les changements), qu'une diminution des coûts associés aux soins des animaux que ce type de cage gagna en popularité (Hessler, 1999).

Depuis 2014, un nouveau type de cage ventilée individuellement (IVC) impliquant un système de scellage à pression positive lors de leur débranchement de leur portoir de ventilation sont de plus en plus utilisées dans le cadre de recherches et l'hébergement de rongeurs axéniques et gnotobiotiques (Hecht et al., 2014; Niimi et al., 2019; Niimi and Takahashi, 2019; Paik et al., 2015). Pour ne nommer que quelques modèles, la compagnie Allentown (NJ, É.-U.) propose son système *Sentry SPP™ Mouse sealed positive pressure*

IVC présenté à l'[Annexe G](#) (Allentown, 2019), tandis que Tecniplast (Montréal, Canada) propose son système *d'ISOcage* (Tecniplast, 2016; Tecniplast, 2018).

### 0.3 : L'ISOcage et ses infrastructures

L'ISOcage P de Tecniplast (renommée Isocage pour le reste de l'ouvrage) est un isolateur au niveau de la cage qui a été conçu afin d'octroyer le niveau de sécurité d'un isolateur, en plus des avantages d'un IVC en termes d'ergonomie, de flexibilité et de densité animale par pièce (Tecniplast, 2016; Tecniplast, 2017b). Elle a été spécialement conçue comme système de bioexclusion pour les animaux gnotobiotiques, axéniques et immunodéprimés (Tecniplast, 2016; Tecniplast, 2017b).

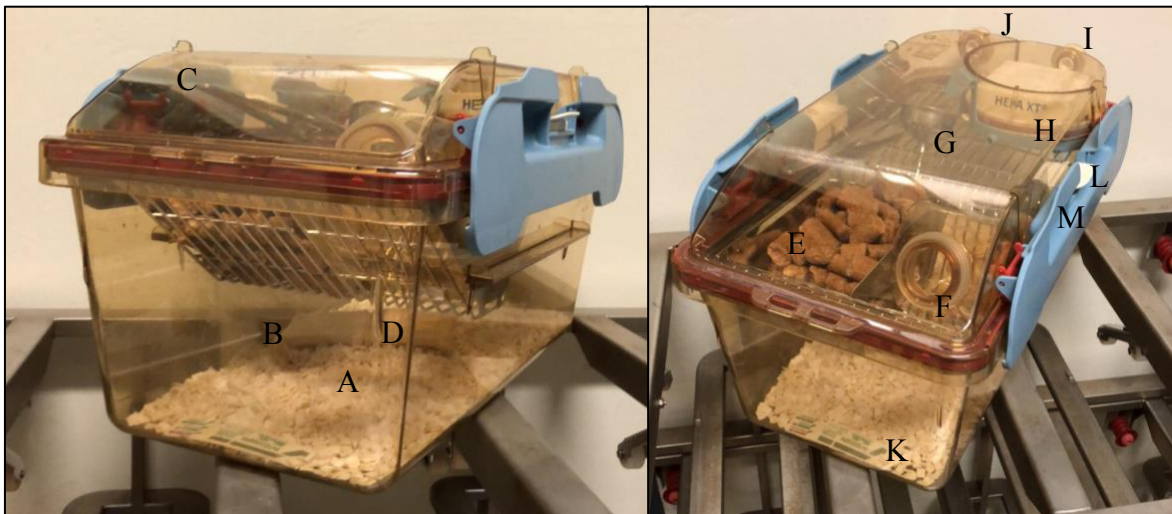


Illustration 5 : Photos d'un ISOcage P de Tecniplast.

Isocage stérilisée prête pour un changement de cage. A, litière; B, matériel d'enrichissement (Ouate); C, pinces; D, extrémité de la bouteille d'eau; E, nourriture; F, bouteille d'eau vide; G, entonnoir pour remplir la bouteille d'eau; H, filtre HEPA; I, port d'entrée d'air; J, port de sortie d'air; K; indicateur biologique de stérilisation (dans cage témoin seulement); L et M, système à doubles pinces d'ouverture/fermeture de la cage. (Photos Alexandre Pleau)

L'Isocage (Illustration 5) est stérilisable à l'autoclave, étanche à l'air et hermétique. Elle est équipée d'un système de fermeture à doubles pinces et doubles joints, ainsi que de valves à fermeture automatique lors de son débranchement du portoir d'hébergement, permettant un maintien de la pression interne et un environnement sécuritaire pour l'animal (Tecniplast, 2016). Le portoir d'hébergement pour Isocage ([Annexe H](#)) peut contenir 30 à 72 cages et possède un système de ventilation contrôlé par microprocesseurs afin d'assurer une ventilation constante et sécuritaire dans toutes les cages qu'il contient (Tecniplast, 2016). Il possède deux ventilateurs, ainsi qu'une batterie de secours ayant une autonomie de plus de 24h en cas de panne électrique (Tecniplast, 2016). Sa forte capacité de bio-exclusion due à la filtration HEPA au niveau de chaque cage offre donc la possibilité de réaliser de multiples études différentes dans le même portoir d'hébergement avec une protection maximale pour chaque cage (Tecniplast, 2016; Tecniplast, 2017b).

### **0.3.1 : Station de biosécurité pour Isocage (IBS)**

Afin d'éviter l'introduction de contaminants biologiques dans les Isocages lors de leur ouverture, celles-ci doivent être ouvertes dans un environnement sécuritaire, soit la station de biosécurité pour Isocage (*ISOcage Biosafety Station* ou IBS, [Annexe H](#)). Il s'agit d'une enceinte de sécurité biologique de classe 2, type A2; par conséquent elle assure la sécurité autant des animaux dans la hotte que celle du personnel et de son environnement (Gouvernement du Canada, 2018; Tecniplast, 2018). L'IBS possède un poste de travail ainsi qu'un port à sa droite, précédée d'un bassin d'immersion afin d'effectuer une désinfection chimique par trempage du matériel entrant dans la station (Tecniplast, 2018). L'IBS est également équipée d'un panneau de commande permettant une surveillance constante des conditions de travail, ainsi que de l'état des constituants, dont les filtres HEPA qu'elle contient (Tecniplast, 2018). Les plus récents modèles d'IBS possèdent également une lampe ultraviolet et peuvent être équipées d'une chambre de transfert «autoclave» (Tecniplast, 2017a; Tecniplast, 2018). Le port de gauche est généralement utilisé lors des arrivages d'animaux du fournisseur (Hecht et al., 2014). Cependant, il a été mentionné dans la littérature que certains utilisateurs d'Isocage utilisaient une hotte à flux laminaire afin

d'effectuer leurs changements de cage, laquelle ne possède pas de bassin d'immersion intégré (Hecht et al., 2014; Niimi et al., 2019).

### **0.3.2 : Désinfectants**

Le désinfectant recommandé par le fournisseur pour la désinfection de l'IBS et pour le bassin d'immersion est une solution à 200 ppm de MB-10 (Quip Laboratories, Wilmington, DE, É.-U.). Ce produit est fourni sous forme de tablettes de 1.5 ou 6 grammes à diluer dans de l'eau, ce qui ne demande pas beaucoup d'espace de rangement et le rend facile à utiliser. Les comprimés effervescents contiennent du chlorite de sodium et du dichloroisocyanurate de sodium dihydraté qui produisent en quelques minutes du dioxyde de chlore lorsqu'ils sont hydratés. La solution finale est stable et peut être utilisée jusqu'à sept jours après sa préparation. Une poudre neutralisante (QLI Neutralizer Powder, Quip Laboratories) est fournie avec les tablettes de MB-10 afin de pouvoir disposer de manière sécuritaire et écologique du désinfectant après son emploi. Selon le fournisseur, le MB-10 a été conçu pour être utilisé idéalement sur les surfaces dures et non poreuses, et dans différents types d'établissement, dont ceux où l'on trouve des animaux de laboratoire, les cliniques et les hôpitaux vétérinaires, ainsi que pour d'autres usages collectifs et industriels (Quip Laboratories Inc, 2020).

Bien qu'il soit un désinfectant bactéricide, virucide, tuberculocide extrêmement efficace, le MB-10 présente certains inconvénients (Quip Laboratories Inc, 2020). En effet, selon la fiche signalétique du produit, celui-ci sous sa forme active peut induire des irritations et corrosions cutanée (catégorie 1C), des toxicités aiguës pour la peau (catégorie 3) et par voie orale (catégorie 4), est dangereux pour l'environnement aquatique de manière aiguë et chronique (catégorie 1) et finalement, il est oxydant sous sa forme solide (catégorie 1) (Quip Laboratories Inc, 2013). De plus, le MB-10 libère des gaz toxiques lorsqu'il est hydraté, par conséquent, lors d'une exposition prolongée (plus de 15 minutes), les travailleurs doivent porter un masque à cartouche chimique, un écran facial et des gants de protection (Quip Laboratories Inc, 2013). Finalement, le MB-10 est corrosif pour les surfaces et les joints de l'IBS, ce qui conduit à une dégradation précoce des matériaux. Par contre il a été démontré

récemment que son utilisation est moins dommageable pour les équipements que ne l'est un désinfectant à base de peroxyde (Moody et al., 2019).

Cependant, à la lumière des recommandations de Moody et ses collaborateurs dans leur étude portant sur la détermination du désinfectant le plus approprié pour la désinfection des surfaces gnotobiotiques (basé sur l'activité sporicide, les dommages aux métaux et à l'acrylique, ainsi que la destruction efficace des microorganismes aérosolisés), le MB-10 (Désinfectant A) est celui qu'ils ont jugé le plus approprié, tandis que le Clidox® (Désinfectant B) est celui qui l'était le moins (Moody et al., 2019). Par contre, cet article, ni aucun autre d'ailleurs, ne présente l'efficacité du MB-10 ou tout autre désinfectant lorsqu'utilisé pour la désinfection par trempage dans un bassin d'immersion. À ce propos, le fournisseur d'IBS recommande un temps de trempage de 5 minutes lors de l'entrée de cages dans la station. Le temps d'autonomie en oxygène dans les cages scellées étant limité et le temps associé à la manipulation des cages étant précieux, le délai de désinfection devient alors un facteur limitant du côté du nombre de cages pouvant être manipulé par jour, ce qui a un impact direct sur la durée du temps technique, la quantité de désinfectant utilisé et les investissements monétaires associés à chaque ouverture de cage.

#### **0.4 : Changements de cages et précautions axéniques**

Les changements de cages en conditions axéniques et les précautions utilisées, bien qu'il n'y ait aucune standardisation appliquée à toutes les institutions axéniques, vont varier surtout selon les infrastructures d'hébergements utilisées.

##### **0.4.1 : Équipements de protection individuel (EPI) et local axénique**

Avant même d'entrer dans une salle axénique, les utilisateurs vont généralement se laver les mains et porter des équipements à usage unique de protection chirurgicaux dont la jaquette, le couvre-cheveux, les gants et les pantoufles. Cependant, les équipements de protection respiratoire vont différer d'un article à l'autre et vont majoritairement varier entre le masque N95 (Lange et al., 2019), le masque facial complet (Niimi et al., 2019), le demi-masque contenant des cartouches 3M (Paik et al., 2015) et finalement un masque de protection



respiratoire (Paik et al., 2015) lorsque le personnel doit travailler auprès un bassin d'immersion chimique (non attaché à la hotte). Autrement, il a été répertorié dans la littérature que l' «acide léger à l'hypochlorite de sodium» (SAH) pouvait être utilisé afin de laver les planchers chaque jour ouvrable et les murs et plafonds à chaque semaine dans un local contenant des isolateurs au niveau de la cage comme l'Isocage (Niimi et al., 2019).

#### **0.4.2 : Entrée du matériel dans les infrastructures d'hébergement**

Pour les utilisateurs d'isolateurs traditionnels, le matériel entrant nécessaire à un changement de cage dont la nourriture, emballée en portions individuelles, et la litière sera généralement stérilisé ensemble dans un cylindre, tandis que l'eau stérilisée sera introduite dans un cylindre séparé (Arvidsson et al., 2012). Lors du branchement du cylindre à une chambre de transfert (connectée à l'isolateur), les deux ouvertures sont désinfectées par fumigation (Clidox) pendant 1h avant d'entrer le matériel dans l'isolateur (Arvidsson et al., 2012). C'est en général à ce moment que les échantillons et/ou les déchets de changement de cage seront exportés de l'isolateur et transférés dans le cylindre maintenant vide. L'intérieur de la chambre sera de nouveau fumigé après le débranchement du cylindre (Arvidsson et al., 2012). Pour l'entrée d'équipement ne pouvant pas être stérilisé à la chaleur comme les diètes, leur traitement par irradiation est conseillé, tandis que les liquides, non stérilisables ni par la chaleur, ni l'irradiation, devraient être filtrés stérilement dans un tube qui sera fumigé au peroxyde d'hydrogène avant son entrée (Arvidsson et al., 2012).

Pour ce qui est de l'entrée du matériel pour les utilisateurs utilisant l'Isocage sans IBS, les utilisateurs utilisent généralement une solution 1:3 :1 de Clidox® (Pharmaceutical Research Laboratories, Waterbury, CT, É.-U.), désinfectant à base de chlorite de sodium. Ils l'utilisent sous forme de vaporisateur uniquement pour désinfecter tout le matériel entrant avant leur entrée dans la station (Arvidsson et al., 2012; Hecht et al., 2014; Lange et al., 2019; Lavin et al., 2018), tandis que d'autres vaporisent l'intérieur de la hotte, les matériaux entrants, et finalement immergent les cages pendant 30 secondes dans un bassin non connecté à la station directement avant leur entrée (Paik et al., 2015). Autrement, certains utilisateurs ont recours aux mêmes techniques que celles utilisées par les chirurgiens dans les blocs

opératoires afin de maintenir les cages axéniques (Lange et al., 2019; Paik et al., 2015). Par exemple, ils vont emballer doublement le matériel perméable non-autoclavé dans les cages de deux champs stériles, la première couche étant retirée par un premier utilisateur, tandis qu'un second manipulateur, «propre» et dédié à l'intérieur du cabinet de biosécurité, pourra prendre le contenu en limitant les risques de le contaminer en l'entrant, tandis que les cages ou autres matériel imperméable seront désinfectés par vaporisateur chimique pour leur entrée (Lange et al., 2019; Paik et al., 2015). Comme mentionné précédemment, la nourriture et la litière sont normalement stérilisées directement dans les cages, tandis que l'eau sera stérilisée à part et introduites dans les bouteilles dans le cabinet à l'ouverture des cages (Niimi et al., 2019; Paik et al., 2015). Le cabinet est généralement désinfecté avec un vaporisateur au SAH 10 minutes avant l'entrée du matériel (Niimi et al., 2019). Autrement, l'usage de peroxyde d'hydrogène vaporisé, comme retrouvé dans l'Oxivir® Plus (Diversey™, Fort Mill, SC, É.-U.) et le Virkon™ (Vetoquinol, Lavaltrie, Québec, Canada), est pratique courante en animalerie de recherche lors de l'entrée de matériel dans des hottes de biosécurité (Alfa et al., 2010; Hornig et al., 2016), ainsi que la désinfection par gaz, consistant à fumiger au peroxyde d'hydrogène le matériel ou les surfaces (Andersen et al., 2006).

## **0.5 : Méthode de détection d'une contamination microbienne**

Les méthodes de détections utilisées aujourd'hui afin de détecter des contaminants biologiques chez des animaux axéniques ont énormément évolué au fil des années. C'est en grande partie grâce aux de découvertes majeures des dernières décennies, comme entre autres l'établissement de la structure en double hélice de l'ADN en 1953 (Watson and Crick, 1953), ayant engendré l'avènement de nouvelles technologies de détection de microorganismes. Par conséquent, c'est l'avènement perpétuel de nouvelles technologies de biologie moléculaire et de nouvelles connaissances permettant de détecter ou caractériser les formes de vie qui amène le concept même de l'axénie à se complexifier, et les méthodes à varier. Cette réflexion a d'ailleurs été effectuée en 1942 par Reyniers ayant mentionné que *«l'animal dit sans germe est exempt de germes uniquement dans les limites des techniques utilisées pour déterminer son absence de contamination microbienne»* [traduction libre](Reyniers, 1943).

Avant l'accession de la biologie moléculaire, les méthodes de microbiologie dites classiques étaient celles les plus utilisées afin de confirmer le statut axénique d'un animal. Ces méthodes incluent les approches par culture et les observations microscopiques d'échantillon. À ce jour, il n'y a pas de consensus quant à la méthode à privilégier pour la détection de contaminants microbiologiques en condition axénique. Cependant, le choix des méthodes et leur fréquence d'application vont dépendre majoritairement des infrastructures d'hébergement utilisées, des microorganismes recherchés et finalement des capacités financières des utilisateurs.

Tel qu'indiqué précédemment, l'axénie des premiers animaux sans germes obtenus fut démontrée en observant au microscope le contenu intestinal et les organes des animaux (avec ou sans coloration des échantillons), ainsi qu'en observant en culture de la nourriture, du lait et des excréments récoltés tout au long du protocole dans une multitude de tubes de cultures différentes (Rosenthal, 1896). Plus de 60 ans plus tard, la culture d'échantillons et la microscopie furent encore les méthodes les plus utilisées. Gustafsson, mentionné précédemment pour l'élaboration d'isolateur axénique, utilisait six types de milieux de culture (bouillon au glucose, milieu cerveau-foie-cœur, milieu et bouillon au thioglycolate, gélose Sabouraud et gélose sang) incubés jusqu'à trois semaines à température ambiante et à 37°C en conditions aérobie et anaérobie (Gustafsson, 1959). Il utilisait également la microscopie directe de frottis fécaux, qu'il considérait très utiles, car les contaminants étaient parfois difficiles à cultiver (Gustafsson, 1959). Ces techniques furent d'ailleurs les plus utilisées, jusqu'au début des années 2010, alors que les méthodes de biologie moléculaire furent utilisées pour la première fois afin de confirmer le statut axénique d'animaux (Faith et al., 2010). De nos jours, les méthodes de contrôle de qualité microbiologique des animaux axéniques diffèrent selon le type d'infrastructure d'hébergement, mais sont généralement un mélange entre la culture, la biologie moléculaire et la microscopie (Schoeb et al., 2017). Dans les isolateurs traditionnels, tous les animaux partagent le même environnement, tandis que les cages ventilées individuellement et les cages scellées comportent leur propre microenvironnement qui diffère d'une cage à l'autre. Par conséquent, les isolateurs au niveau de la cage demandent techniquement plus d'investissement général étant donné qu'elles

représentent plus d’environnements différents à contrôler qu’un isolateur. Sans oublier qu’entre chaque cage, des précautions sont de mise afin d’éviter des contaminations croisées.

### 0.5.1 : Méthode par culture

Les protocoles de détection par culture utilisés de nos jours sont extrêmement variables d’une installation axénique à l’autre indépendamment du type d’infrastructure d’hébergement. Tel qu’indiqué au Tableau 1, types d’infrastructure d’hébergement, les échantillons de matières fécales sont les plus utilisés (Arvidsson et al., 2012; Basic and Bleich, 2019; Fontaine et al., 2015; Karaman, 2015; Lange et al., 2019; Nicklas et al., 2015; Niimi et al., 2019; Paik et al., 2015), tandis que le contenu caecal des animaux (Fontaine et al., 2015; Karaman, 2015), leur organes (Hecht et al., 2014; Karaman, 2015), la litière (Basic and Bleich, 2019; Hecht et al., 2014; Niimi et al., 2019), l’eau des cruches (Hecht et al., 2014; Niimi et al., 2019), la nourriture (Basic and Bleich, 2019; Lange et al., 2019; Nicklas et al., 2015) et les surface de cages (Basic and Bleich, 2019; Hecht et al., 2014; Niimi et al., 2019) peuvent l’être également utilisées selon les rapports.

Tableau 1 : Échantillons les plus utilisés dans la littérature pour la recherche de contaminants en animalerie axénique par culture.

<b>Échantillon</b>	<b>Référence</b>
Matières fécales	Arvidsson et al., 2012; Basic and Bleich, 2019; Fontaine et al., 2015; Karaman, 2015; Lange et al., 2019; Nicklas et al., 2015; Niimi et al., 2019; Paik et al., 2015
Litière souillée	Basic and Bleich, 2019; Hecht et al., 2014; Niimi et al., 2019
Nourriture	Basic and Bleich, 2019; Lange et al., 2019; Nicklas et al., 2015
Surface interne des cages	Basic and Bleich, 2019; Hecht et al., 2014; Niimi et al., 2019
Eau des cruches	Hecht et al., 2014; Niimi et al., 2019
Contenu caecal	Fontaine et al., 2015; Karaman, 2015)
Organes	Hecht et al., 2014; Karaman, 2015

Les milieux de culture (Tableau 2) varient beaucoup et résultent souvent en un amalgame de milieux liquides et/ou solides entre les milieux : cœur-cervelle (Arvidsson et al., 2012; Nicklas et al., 2015; Niimi et al., 2019), le thioglycolate (Nicklas et al., 2015; Niimi et al., 2019), le milieu nutritif (Arvidsson et al., 2012; Hecht et al., 2014), le milieu soya trypticase (Hecht et al., 2014), la gélose sang (Fontaine et al., 2015; Nicklas et al., 2015), la gélose brucella (Hecht et al., 2014) parfois supplémentée (Paik et al., 2015), la gélose MacConkey (Hecht et al., 2014), la gélose Columbia avec 5% de sang (Lange et al., 2019), le bouillon de viande cuite (Niimi et al., 2019), ou bien la gélose d'isolation pour *Pseudomonas* (Hecht et al., 2014). Le milieu sabouraud (Arvidsson et al., 2012; Hecht et al., 2014; Nicklas et al., 2015) et la gélose pomme de terre dextrose (Niimi et al., 2019) sont utilisées à l'occasion pour vérifier la présence des moisissures et/ou levures.

Tableau 2 : Milieux de culture les plus utilisés dans la littérature pour la recherche de contaminants en animalerie axénique par culture.

<b>Milieu</b>	<b>Référence</b>
Cœur-cervelle	Arvidsson et al., 2012; Nicklas et al., 2015; Niimi et al., 2019
Thioglycolate	Nicklas et al., 2015; Niimi et al., 2019
Nutritif	Arvidsson et al., 2012; Hecht et al., 2014
Soya trypticase	Hecht et al., 2014
Gélose sang	Fontaine et al., 2015; Nicklas et al., 2015
Brucella Agar	Hecht et al., 2014
Brucella supplémenté	Paik et al., 2015
Gélose MacConkey	Hecht et al., 2014
Gélose Columbia avec 5% de sang	Lange et al., 2019
Bouillon de viande cuite	Niimi et al., 2019
Gélose d'isolation pour <i>Pseudomonas</i>	Hecht et al., 2014
Sabouraud	Arvidsson et al., 2012; Hecht et al., 2014; Nicklas et al., 2015
Gélose pomme de terre dextrose	Niimi et al., 2019

La température d'incubation la plus utilisée est de 37°C (Fontaine et al., 2015; Lange et al., 2019; Nicklas et al., 2015; Niimi et al., 2019; Paik et al., 2015), tandis que des températures inférieures à 30°C afin de cibler les bactéries environnementales (Nicklas et al., 2015; Niimi et al., 2019; Paik et al., 2015) et parfois même à des températures supérieures comme 56°C (Nicklas et al., 2015) sont ajoutées dans certains protocoles. Les conditions environnementales les plus utilisées sont en aérobiose et en anaérobiose (Arvidsson et al., 2012; Fontaine et al., 2015; Lange et al., 2019; Nicklas et al., 2015; Paik et al., 2015), bien que dans certains cas, du dioxyde de carbone est également utilisé (Hecht et al., 2014). Les temps d'incubation varient entre 24h (Fontaine et al., 2015), 48h (Arvidsson et al., 2012), 7 jours (Hecht et al., 2014; Lange et al., 2019; Nicklas et al., 2015) ou jusqu'à 14 jours (Niimi et al., 2019; Paik et al., 2015). Dans certains rapports, une première étape de culture des échantillons en milieu liquide est effectuée avant d'en transférer un volume sur milieu solide à des fins de décomptes de colonies (Hecht et al., 2014). Cependant, bien que la culture soit simple et peu coûteuse, elle comporte des limites quant aux exigences nutritives ou quant à la vitesse de croissance de certains microorganismes, ce qui peut engendrer des résultats erronés (Fontaine et al., 2015). Les cultures sont faciles à contaminer et les faux positifs peuvent entraîner une perte non désirée de temps, de matériaux ou d'animaux (Fontaine et al., 2015), et les chances de contamination augmentent si l'échantillon doit subir beaucoup de traitements avant l'incubation. À l'opposé, il est également possible que la culture engendre des faux négatifs si les microorganismes contenus dans l'échantillon ne rencontrent pas les exigences nutritionnelles et environnementales minimales à leur croissance dans les conditions de culture utilisées. Il en va de même si le temps d'incubation n'est pas assez long, ce qui ne permettrait pas aux microorganismes à croissance lente, dont les moisissures, de s'être assez développées afin de les détecter macroscopiquement. Il est donc important de choisir des milieux de culture et des conditions et durées d'incubation qui englobent le plus de microorganismes possibles afin d'augmenter les chances de détecter des contaminants cultivables en animalerie axénique.

Autrement, l'utilisation d'une «trappe à nourriture» humidifiée régulièrement et qui reste constamment dans les isolateurs traditionnels a été mentionnée par Nicklas et ses collaborateurs afin de détecter les possibles contaminations par les moisissures et les levures

(Nicklas et al., 2015). L'utilisation de la trousse de culture *SensiMedia* de la compagnie japonaise *MiroBio* a également été mentionnée pour la détection de contaminants aérobies en cages axéniques (Niimi et al., 2019). Cette trousse arrive prête à utiliser et a la particularité de posséder un indicateur colorimétrique qui passe du bleu au jaune lorsqu'il y a présence de microorganismes vivants dans l'échantillon (MicroBio, 2020).

### **0.5.2 : Méthode par microscopie**

Les méthodes par microscopie impliquent l'utilisation d'un microscope afin de vérifier la présence ou l'absence de contaminants microbiens dans un échantillon. La méthode la plus utilisée en conditions axénique est l'utilisation de la coloration de Gram. Celle-ci s'effectue à grossissement 1000x avec de l'huile à immersion en diluant des fèces fraîches et/ou le contenu caecal des animaux dans de l'eau ou de la saline stérile (Schoeb et al., 2017). Par contre, il a été mentionné que les bactéries à Gram négatif pourraient être sous-estimées par cette méthode et qu'il était impossible de conclure sur la viabilité des organismes avant la coloration (Fontaine et al., 2015; Nicklas et al., 2015; Niimi et al., 2019). La coloration de Gram peut permettre de détecter des microorganismes non cultivables s'ils sont présents en quantité suffisante (Fontaine et al., 2015). C'est ce qu'à démontrer Fontaine et ses collaborateurs en observant une fèces ou du contenu caecal, écouvillonnés directement sur une lame, puis traités avec la coloration de Gram. En dénombrant dans 25 champs à grossissement 1000x toutes les bactéries ou les cellules ressemblant à des bactéries s'y retrouvant, un échantillon fortement contaminé ayant une concentration de  $10E+09$  unité formatrice de colonies par gramme (UFC/g) de fèces ou plus permettrait d'identifier dans tous les cas une contamination, tandis qu'à des concentrations intermédiaires ( $10E+07$  à  $10E+08$  UFC/g de fèces), les résultats de lecture étaient plutôt variables d'une lame à l'autre (Fontaine et al., 2015).

Cependant, les diètes des animaux de laboratoire contiennent de nombreuses petites particules de débris qui peuvent ressembler à des bactéries à Gram négatif, et elles comportent même des bactéries, en particulier des gros bacilles à Gram positifs généralement évidents, lorsqu'elles sont générées à partir d'ingrédients naturels (Schoeb et al., 2017). À

cet effet, il a été mentionné et démontré dans la littérature que les bactéries présentes dans la nourriture avant l'autoclavage ou après irradiation peuvent être détectées par microscopie, car elles conservent leur morphologie bactérienne même après le passage dans le tractus digestif et conservent la possibilité d'absorber du colorant, bien qu'elles ne soient pas détectables par biologie moléculaire en raison de la dégradation de leur ADN (Fontaine et al., 2015; Midtvedt and Gustafsson, 2005; Nicklas et al., 2015; Niimi et al., 2019; Taylor et al., 1986). Il est alors possible que certaines des formes bactériennes observées en microscopie dérivant de bactéries mortes pendant la stérilisation de la nourriture soient comptées. C'est également le cas pour la technique du montage-humide, où des microorganismes, utilisés dans l'élaboration des diètes, peuvent être visibles au montage-humide et après coloration, comme c'est le cas des levures utilisées comme source de vitamines et des *Lactocoques* utilisés dans la préparation de la caséine de certains régimes (Schoeb et al., 2017). Cela complique donc beaucoup l'analyse lorsqu'on veut démontrer qu'un animal est démuné de microorganismes. À cet effet, on conseille souvent d'interpréter les résultats de microscopie conjointement aux résultats de culture et de biologie moléculaire (Schoeb et al., 2017). On recommande également l'expertise d'un microscopiste expérimenté étant donné que la maîtrise des techniques de microscopie nécessite une certaine pratique (Packey et al., 2013; Schoeb et al., 2017).

Autrement, d'autres techniques de microscopie sont utilisées, bien que moins fréquemment, dont la recherche d'ectoparasites sur la fourrure des animaux et d'endoparasites dans leur contenu intestinal chez les animaux axénique en observant ces types d'échantillons en montages humides ou avec la coloration de Giemsa (Karaman, 2015). Les techniques de microscopie par fluorescence utilisant des fluorochromes comme le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) peuvent être utilisées afin de détecter l'ADN de microorganismes dans les animaux axéniques comme les bactéries (Nicklas et al., 2015) et les levures et moisissures (Karbach et al., 2016), mais une fois encore la distinction entre les cellules mortes et vivantes est impossible avec cette méthode. L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), également une technique de microscopie par fluorescence, a elle aussi été mentionnée comme technique afin de détecter les bactéries pouvant être présentes dans les tissus d'intestins d'animaux axéniques lors de leur nécropsie (Lange et al., 2019).



### 0.5.3 : Méthodes de biologie moléculaire

L'utilisation de méthodes de biologie moléculaire comporte l'avantage de permettre la détection de microorganismes non cultivables ou difficiles à isoler par culture qui pourraient coloniser des animaux axéniques (Schoeb et al., 2017). Les réactions de polymérase en chaîne (PCR) non quantitatives (Arvidsson et al., 2012; Lange et al., 2019; Paik et al., 2015) et quantitatives (Fontaine et al., 2015; Packey et al., 2013) avec des amorces ciblant la région conservée du gène de l'ARNr 16S sont les plus populaires afin de détecter des contaminants bactériens chez des animaux axéniques. L'usage de ce type d'amorces universelles est optimal pour la détection de bactéries étant donné que l'identité des contaminants n'est pas connue. Les excréments de souris sont l'échantillon le plus utilisé, conjointement à leur traitement via des trousse d'extraction d'ADN spécialement conçues pour les fèces (Fontaine et al., 2015; Lange et al., 2019; Nicklas et al., 2015; Paik et al., 2015). Cela permettrait de réduire la possibilité d'interférence ou d'inhibiteurs contenus dans la nourriture présente dans les fèces. Par contre, l'usage d'une trousse d'extraction d'ADN environnemental a été observée dans la littérature pour l'extraction d'échantillons axéniques (Arvidsson et al., 2012). De plus, il faut être extrêmement vigilant lors du traitement des échantillons axéniques utilisés pour la biologie moléculaire étant donné que tous les microorganismes entrant dans l'échantillon peuvent potentiellement engendrer de l'amplification, donc des faux positifs. Ce type de méthode comporte donc un important risque de contamination (Nicklas et al., 2015). Il a été répertorié que la présence d'autres microorganismes que les bactéries soit parfois recherchée par biologie moléculaire, soit celle des *Archaea* et des moisissures (Packey et al., 2013), ainsi que de certains virus spécifiques (Nicklas et al., 2015)

De plus, des auteurs suggèrent que des résultats négatifs ne sont pas nécessairement une preuve concluante de l'absence de contaminants, en raison des facteurs pouvant induire la non-production de produits d'amplification détectables, même si des séquences cibles sont présentes (Fontaine et al., 2015; Schoeb et al., 2017). Fontaine et ses collaborateurs ont d'ailleurs répertorié ne pas avoir détecté par PCR un contaminant ajouté volontairement dans les fèces à une concentration d'environ  $10E+05$  UFC/g de matières fécales en utilisant des amorces 16S «à large spectre», bien que ce contaminant était détectable par culture (Fontaine

et al., 2015). Cependant, il a été mentionné que des résultats faussement positifs pourraient être obtenus en raison une fois encore des bactéries mortes présentes dans les aliments et la litière (Schoeb et al., 2017). Par contre, en raison de la fragmentation de l'ADN lors de la stérilisation, cela peut être évité, mais également en utilisant des méthodes ciblant des segments suffisamment grands du gène de l'ARNr 16S, comme proposé par Nadkarni et ses collaborateurs (Nadkarni et al., 2002; Schoeb et al., 2017). Cependant, l'idée qu'un contaminant en faible concentration puisse être présent dans des animaux axéniques hante plusieurs utilisateurs étant donné qu'aucune méthode n'est capable de détecter efficacement un contaminant peu abondant (Fontaine et al., 2015; Schoeb et al., 2017). Cependant, aucun des auteurs ayant répertorié des contaminations accidentelles chez des animaux axéniques n'ont indiqué que le contaminant se retrouvait en faible concentration, bien au contraire, ils étaient souvent retrouvés en grande concentration (Fontaine et al., 2015; Packey et al., 2013). Par contre, il n'y a pas encore de confirmation dans la littérature que des contaminations microbiennes à faibles concentrations sont possible étant donné qu'aucune n'a été répertoriée jusqu'à maintenant. Il faut cependant se demander si les contaminations de modeste concentration n'ont pas été encore répertoriées en raison des limites de détection des méthodes utilisées actuellement, ou parce que ce profil n'est simplement pas possible en condition axénique.

Comme pour les autres méthodes précédemment décrites, certains rapports recommandent d'utiliser la biologie moléculaire si les utilisateurs obtiennent des résultats non concluants avec les méthodes traditionnelles (Packey et al., 2013). D'autres auteurs proposent, quant à eux, l'usage de PCR et de qPCR pour comme test de confirmation pour les résultats positifs d'une culture (Nicklas et al., 2015), ou bien l'utilisation de la PCR afin de détecter les bactéries tardives ou fastidieuses (Karaman, 2015). Cependant, il faut garder en tête que les techniques de biologie moléculaire, contrairement à celles de culture et de microscopie, ne permettent pas de détecter plusieurs types de microorganismes en un seul test. En effet, bien qu'il existe des amorces universelles pour détecter toutes les bactéries, l'usage de cette paire d'amorce ne permettra pas de détecter les levures ou moisissures, situation possible en culture, par exemple. Une deuxième réaction devra alors être effectuée afin de déceler la présence de d'autres types de microorganismes dans un même échantillon

par biologie moléculaire. Autrement, la structure génomique des virus étant très différente d'un virion à l'autre, il n'est pas possible d'utiliser des amorces à «large spectre» sur ce type de microorganismes. L'usage d'amorces spécifiques est alors recommandé afin de les détecter, ce qui nécessite beaucoup d'étapes supplémentaires et une augmentation des coûts associés au contrôle de la qualité.

#### **0.5.4 : Autres méthodes**

L'utilisation d'autres approches pour évaluer la présence de contaminants peut inclure la mise en culture liquide d'un échantillon, suivit de la prise de densité optique pour quantifier la croissance microbienne, l'estimation de la concentration d'ADN par spectrophotométrie (Packey et al., 2013), ainsi que des tests sérologiques. La prise de la densité optique consiste à mesurer l'absorbance (ou la densité optique) d'un échantillon liquide en le comparant avec un témoin négatif (sans échantillon). En contexte axénique, l'augmentation de la densité optique dans un échantillon peut indiquer une augmentation de la turbidité dans le milieu en raison de la prolifération des contaminants (Hecht et al., 2014). Les tests sérologiques consistent à rechercher des molécules biochimiques comme des anticorps dans la partie liquide du sang et sont généralement utilisés afin de détecter des infections virales, ou bien d'autres organismes comme les mycoplasmes, bactéries intracellulaires, chez les animaux axéniques (Nicklas et al., 2015; Schoeb et al., 2017).

#### **0.5.5 : Collecte d'échantillons et fréquence d'échantillonnage**

Il n'y a aucun consensus ni de directives strictes quant à la fréquence de surveillance des contaminations microbiologiques chez les animaux axéniques (Schoeb et al., 2017). Par contre, la collecte et la fréquence d'échantillonnage afin de confirmer leur statut vont dépendre en général des infrastructures d'hébergement, du nombre d'animaux hébergés et du type de microorganismes à rechercher. Globalement, la plupart des installations axéniques vont contrôler l'axénie de leurs animaux à chaque mois, tandis que d'autres vont plutôt opter pour des vérifications hebdomadaires ou aux deux semaines (Schoeb et al., 2017).

Le risque d'entrée d'un contaminant dans l'environnement d'un animal axénique est l'un des paramètres les plus considérés afin de déterminer la fréquence de leur détection. Ces risques dépendent des procédures effectuées, de l'expérience du personnel manipulant les animaux, de la durée d'exposition des animaux à l'environnement interne de la station de biosécurité, etc. (Nicklas et al., 2015). Ce sont par conséquent les sources microbiennes reliées à ces manipulations qui sont les plus probables de contaminer les animaux, qui incluent les microorganismes associés aux manipulateurs (ex : bactéries de la peau humaine ou moisissures de l'environnement introduites en raison d'un bris dans les gants), ceux colonisant les autres animaux contenus dans l'animalerie (ex : bactéries ou levures intestinales de souris sur un équipement mal ou pas assez désinfecté avant son entrée dans la station), ainsi que des microorganismes ayant survécu lors d'une erreur d'autoclavage (ex : bactéries sporulantes ou moisissures) (Basic and Bleich, 2019; Fontaine et al., 2015; Schoeb et al., 2017). Les microorganismes provenant des laboratoires ont également été mentionnés dans la littérature comme probable source de contaminations chez les animaux axéniques (Fontaine et al., 2015). À l'inverse, la détection de contaminants ayant moins de risques d'être retrouvés en isolateur et/ou nécessitant des pratiques plus lourdes (ce qui inclut ceux nécessitant des nécropsies animales comme pour la détection de bactéries intestinales et de levures), est suggérée aux trois mois par Nicklas et ses collaborateurs ou aux 3 à 6 mois par Basic et Bleich (Basic and Bleich, 2019) tandis que la détection de virus et parasites est effectuée aux deux à trois ans en raison de leurs faibles risques d'entrée en environnement axénique (Nicklas et al., 2015). À cet effet, afin d'éviter la transmission de microorganismes transmis *in utero*, les mycoplasmes, *Pasteurella pneumotropica* ou bien *Toxoplasma gondii*, les fournisseurs d'animaux axéniques vont souvent effectuer de la redérivation par hystérectomie d'animaux ou bien du transfert d'embryons (Karaman, 2015). Les risques d'introduction dans les infrastructures d'hébergement axénique de ces microorganismes et des virus, est par conséquent très faible. C'est pour cette raison que les utilisateurs axéniques déploient moins d'énergie afin détecter leur présence que pour les bactéries. Leur détection sera plutôt effectuée chez les souriceaux nouvellement dérivés de souris dont l'état de santé est inconnu ou bien provenant de parents porteurs d'un transmissible verticalement (Schoeb et al., 2017), plutôt que de routine à chaque changement de cage. Un exemple de

recommandation pour la surveillance de contaminants en isolateur traditionnel est présenté au Tableau 3.

Tableau 3 : Exemple de surveillance de contaminants en isolateur axénique

Objet	Fréquence	Échantillon	Méthode
Isolateur	Avant l'introduction des animaux	Écouvillons	Culture, PCR
	À toutes les 4 semaines	Litière/Vieille nourriture	Culture
Animaux	Régulièrement : À chaque 3 (6) mois	Nécroscopie	Multiple*
	À chaque 4 semaines/ avant ou pendant les transferts	Échantillons fécaux	Culture, PCR
Eau, litière, nourriture	À chaque lot	Tests de stérilité de l'autoclave	Indicateurs biologiques

\*Microscopy, culture, virologie, parasitologie, PCR

Le programme de surveillance axénique pour isolateur de Nicklas et al. Propose de tester l'isolateur, les animaux et les matériaux entrant selon des fréquences, des échantillons et des méthodes de détection leur étant propres. (Tableau tiré de Nicklas et al. 2015, Traduction libre par Maria Lebeuf)

Les isolateurs au niveau de la cage étant ouverts plus fréquemment que dans le cas des isolateurs traditionnels, entre autres pour les changements de cages, cela fait en sorte que les animaux qu'ils hébergent sont beaucoup plus à risque d'être contaminés. C'est pour cette raison que la majorité des utilisateurs vont tester leurs animaux pour la recherche de microorganismes par culture à toutes les fois que les cages sont changées, donc en général aux 7 jours (Arvidsson et al., 2012; Niimi et al., 2019), aux 14 jours (Hecht et al., 2014), ou aux 4 semaines (Lange et al., 2019) à deux mois s'il n'y a qu'un seul animal par cage (Basic and Bleich, 2019). Selon la littérature, les échantillons sont récoltés et testés soit pour chaque cage individuellement (Hecht et al., 2014) ou sont regroupés ensemble pour une analyse de groupe (Niimi et al., 2019). Cette dernière manière de procéder, bien qu'elle demande moins d'investissement que la récolte individuelle, ne permet pas par contre de cibler la cage fautive en cas de résultats positifs. Pour ces deux rapports et d'autres, les échantillons sont récoltés et mis en culture au laboratoire (Hecht et al., 2014; Lange et al., 2019; Niimi et al., 2019). Par contre, il va de soi que plus un échantillon subit des traitements et est manipulé, plus il y a de risques qu'il soit contaminé alors qu'il ne l'était pas au départ. De plus, bien que les animaux soient testés par culture à chaque semaine pour Niimi et al., une détection par

biologie moléculaire prend aussi place une fois par mois afin de confirmer les résultats de culture (Niimi et al., 2019).

Donc, en général, il n'y a pas de consensus, mais que des recommandations pour la surveillance du statut des animaux axéniques, et plus il y a de risque qu'un agent entre dans une infrastructure d'hébergement, plus sa présence devrait être vérifiée souvent. En présence d'une contamination, celle-ci pourrait être confirmée la semaine suivante (Nicklas et al., 2015). Selon Schoeb et ses collaborateurs, la détection de microorganismes devrait être effectuée avant le début d'une expérience, de manière périodique pendant l'expérience et à la fin de celle-ci (Schoeb et al., 2017).

## **0.6 : Problématiques, hypothèses et objectifs des travaux de recherche**

### **0.6.1 : Problématiques**

Lorsqu'arrive le moment d'obtenir des animaux axéniques pour un projet, la première question posée aux utilisateurs s'applique au «degré d'axénie» qu'ils souhaitent couvrir par le programme de contrôle de la qualité axénique. La réponse la plus courante à cette question consiste à ne vouloir retrouver aucun agent microbiologique de tout genre chez les spécimens de laboratoire. Il va de soi que la détection d'un seul type de microorganisme peut, dans certains cas, être assez complexe en raison de l'absence de consensus général quant à la meilleure approche afin les détecter et garantir à 100% son absence. Sans oublier que pour certains microorganismes comme les virus, il n'y a pas de technique universelle permettant la détection de tous leurs représentants, ce qui fait que des investigations plus poussées sont nécessaires et l'utilisation de techniques ciblées et/ou variées deviennent requises. Qui dit plus de microorganismes à cibler et plus de technique et de tests à effectuer dit également une augmentation des coûts associés au temps technique et aux matériaux. Cela complexifie grandement le processus décisionnel au niveau des demandes des utilisateurs qui doivent juger du niveau de qualité qu'ils souhaitent atteindre et du niveau de risque qu'ils sont prêts à assumer dans le processus de détection. Pour l'obtention d'animaux axéniques, dont le prix d'acquisition chez un fournisseur est généralement beaucoup plus élevé que pour un animal non-axénique, le choix des méthodes de détection de contaminants devient alors une étape

capitale dans l'élaboration d'un protocole, le niveau de qualité étant limité par les moyens financier du/des utilisateur(s). Y aurait-il moyen alors d'assurer un niveau de qualité et de détection supérieur, mais pour un prix moindre?

### **0.6.2 : Hypothèses**

Premièrement, 1) il sera possible de diminuer les coûts associés aux animaux axéniques en optimisant la désinfection chimique des cages par immersion ainsi que les méthodes de détections qui seront développées. Deuxièmement, 2) il y aura une quantité moindre de microorganismes à la surface de cages contenant des animaux axéniques en raison des types de précaution utilisées. Troisièmement, 3) l'utilisation simultanée de différentes méthodes de détection sera la plus susceptible de détecter efficacement une contamination microbienne dans des Isocages hébergeant des animaux axéniques. Finalement, 4) un profil coûts, bénéfiques et risques pourra être tracé en évaluant l'efficacité des méthodes de détection à démontrer une contamination, ainsi qu'en évaluant les besoins des chercheurs selon la durée d'un protocole, la fréquence d'ouverture des cages et le niveau de qualité microbiologique désiré.

### **0.6.3 : Objectifs**

Ce projet de maîtrise a pour buts de gérer le risque de contamination associé à l'Isocage en optimisant la désinfection par immersion, en déterminant l'efficacité des mesures de précautions axéniques et en développant, validant et optimisant des mesures de détection des contaminants.

Le premier objectif spécifique est de déterminer la charge microbienne retrouvée à la surface des Isocages entre deux changements de cage, d'évaluer l'efficacité sporicide de deux désinfectants, et finalement de déterminer le temps optimal de désinfection par immersion pour des locaux axéniques selon la concentration du désinfectant utilisé et le temps de contact.

Le deuxième objectif spécifique est d'évaluer l'efficacité de mesures de précaution axéniques en comparant les flores retrouvées dans des locaux axéniques et non axéniques ainsi que leur quantité de microorganismes respectifs.

Le troisième objectif spécifique est de développer, valider et optimiser trois méthodes de détections de contaminants microbiens, et d'ultimement vérifier leurs versions optimisées en situation réelle afin de détecter des contaminants artificiellement introduits.

Finalement, la dernière section de cet ouvrage va consister en une discussion générale concernant l'approche coûts et bénéfices selon : les risques associés aux méthodes de détections développées, l'optimisation désinfection et l'efficacité des mesures de précautions. Une conclusion et des perspectives concluront le mémoire.



# **Chapitre 1 : Gérer le risque de contamination dans une animalerie axénique. Article - Managing Bacterial Contamination Risk in an Axenic Mice Animal Facility.**

Article a été soumis le 15 octobre 2020 et accepté le 23 mars 2021 dans la revue *Canadian Journal of Microbiology* sous le numéro de manuscrit CJM-2020-0519.R2.

## **Authors :**

Maria Lebeuf<sup>1</sup>, Nathalie Turgeon<sup>2</sup>, Cynthia Faubert<sup>2</sup>, Justin Robillard<sup>2</sup>, Éric Paradis<sup>2</sup>,  
Caroline Duchaine<sup>1-3</sup>

## **Affiliations :**

- 1) Département de biochimie, microbiologie et bioinformatique, Université Laval, Quebec city, Quebec, Canada.
- 2) Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Quebec city, Quebec, Canada.
- 3) Tier-1 Canada Research Chair on Bioaerosols, Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Quebec city, Quebec, Canada.

## **Corresponding author :**

Address correspondances to Professor Caroline Duchaine, Institut universitaire de cardiologie et pneumologie de Québec - Université Laval, Bureau A2128, 2725 ch Ste-Foy, Québec, QC, Canada, G1V 4G5 or email [caroline.duchaine@bcm.ulaval.ca](mailto:caroline.duchaine@bcm.ulaval.ca)

## 1.1 : Résumé

Un écart existe entre les bonnes pratiques de laboratoire avec les animaux axéniques et les procédures appliquées. Cette étude visait à choisir le désinfectant approprié entre un au dichloroisocyanurate (MB-10) et un au peroxymonosulfate de potassium (Virkon) et d'ajuster le temps de trempage du matériel utilisé avec la station de biosécurité pour ISOcage. Un autre but était de comparer la charge microbienne sur des cages hébergeant des animaux dans une salle axéniques (A) et une salle non-axéniques (NA) typique sans pathogènes spécifiques (SPF) afin d'identifier les microorganismes résistants ciblés pour un temps de trempage plus long, ainsi que d'évaluer la réduction de la concentration microbienne en AR. *Staphylococcus* a été le genre le plus fréquemment isolé (A et NA). En moyenne trois microorganismes producteurs de spores par cages ont été comptés en A. Le temps de désinfections pour atteindre 1 log de réduction avec les spores de *B. atrophaeus* a varié de 138 (100 ppm MB-10) à 290 (Virkon) secondes et en moins de 20 secondes pour *S. epidermidis* (100 ppm MB-10). Les protocoles de gestions utilisés en A ont entraîné une charge de microorganismes 1000 fois inférieures à celle en NA. Les données comparant les charges microbiennes en animalerie SPF et axéniques peuvent être utilisées par les autres animaleries comme comparaison afin d'améliorer l'efficacité de leur procédure de qualité microbiologiques.

## 1.2 : Abstract

A gap exists between good laboratory practises with axenic animals and procedures applied. This work aimed at choosing the appropriate disinfectant between sodium dichloroisocyanurate (MB-10) and potassium peroxymonosulfate (Virkon™) disinfectants and to adjust the soaking time of the material used with ISOcage biosafety stations. Another aim was to compare the microbial load on cage systems hosting mice since two weeks in axenic (AR) rooms and typical specific-pathogen-free (SPF) non-axenic rooms (NAR) to identify resistant microorganisms targeted for longer soaking disinfection as well as evaluate microbial concentration reduction procedures in AR. *Staphylococcus* was the most frequently isolated genus (AR and NAR). An average of three spore-forming microorganisms per cage were counted from AR. The disinfection time to reach 1 log reduction for *Bacillus atrophaeus* spores varied from 138 (100 ppm MB-10) to 290 (Virkon™) seconds and below 20 seconds for *S. epidermidis* (100 ppm MB-10). AR management protocols lead to 1000 times lower microorganisms burden compared to NAR. Data comparing microbial load on SPF and axenic facilities can be used as comparison for facilities aiming at improving the effectiveness of their microbial control procedures.

## 1.3 : Keywords

Germ-free Mice; disinfection; immersion; Log reduction; Sanitizer

## 1.4 : Introduction

Increasing numbers of germ-free (GF) animals are used every day in various research areas, including in host microbiota and microbial research (Backhed et al., 2004; Ridaura et al., 2013; Sommer and Backhed, 2013), cardiovascular health (Bayer et al., 2019; Karbach et al., 2016; Wang et al., 2011), neurological disease (Catanzaro et al., 2015; Jiang et al., 2017; Parashar and Udayabanu, 2017), in host immunity (Belkaid and Hand, 2014; Kamada et al., 2013; Thaïss et al., 2016) and even to study the concordance between cancer and the microbial composition of the host (Iida et al., 2013; Schwabe and Jobin, 2013; Tlaskalova-Hogenova et al., 2011). Nuttall and Thierfelder were the first to generate a GF animal by inventing the first functional GF isolator in 1897 (Nuttall George and Thierfelder, 1897). Since then, axenic housing technologies have steadily evolved in order to meet the many and diverse scientific requirements of research protocols. There is no consensus on GF practises and technologies or the various housing technologies that can be used, such as the traditional isolator (Schoeb and Orcutt, 2017) or cage level isolators like the positive-pressure Isocage (Tecniplast®, Montreal, Quebec, Canada, herein referred to as Isocage)(Hecht et al., 2014; Paik et al., 2015). An average modern isolator is composed of a transparent material that allows for visibility of the inner work surface and gloves that enable handling. It contains cages that share the same air and port for placing items inside. Optional accessories can be added to the isolator such as an autoclavable cylinder, which can be plugged into the entrance port when sterile supplies are ready to be placed inside. However, as mentioned above, animals inside the same isolator share the same air and therefore only one protocol can be performed in a single isolator at a time. Consequently, when contamination occurs, all the animals inside the isolator are at risk. Isocages present several important advantages as they function like mini isolators. Each Isocage has its own individual HEPA-filtered positive ventilation system (efficiency: 99.995%), allowing several simultaneous protocols within the same rack with limited contamination risk between cages. Using this technology, cage opening is performed in an *ISOcage Biosafety Station* (IBS, Tecniplast®). The IBS is a level II biosafety cabinet equipped with a pair of sliding gloves between which there is laminar airflow. It also includes a dunk tank that is used to disinfect materials by immersion, including cages with animals. The IBS supplier recommends using a 200 ppm MB-10 solution (Quip Laboratories, Wilmington, DE, USA) as immersion disinfectant. MB-10

tablets® (Quip Laboratories) contain sodium chlorite and sodium dichloroisocyanurate dihydrate (DCCNa) that rapidly produce chlorine dioxide when hydrated. Although it is extremely effective, MB-10 has some drawbacks. It has extremely toxic effects on the respiratory tract and skin. For prolonged exposure (longer than 15 minutes), workers must wear a chemical cartridge mask, face shield and protective gloves. Moreover, MB-10 being chlorine-based disinfectant, high concentrations can be corrosive on the IBS working surface (stainless steel) and joints (plastic and rubber) and can lead to early degradation of materials, but it has been demonstrated that the use of MB-10 has less impact on equipment integrity than a peroxide-based disinfectant, such as Virkon™ (Moody et al., 2019).

However, not all users of cage-level isolators such as Isocage use a biosafety station with a dunk tank like the IBS. Some are using regular laminar flow biosafety cabinet and to vaporize disinfectant on the cage surface, or to soak cages for 30 seconds in a disinfectant basin not connected to the station, immediately prior to their entry (Lange et al., 2019; Niimi et al., 2019). Another type of laminar flow cabinet equipped with a transfer chamber for the materials entrance, the SC-Plus Safety Cabinet, using a spray of acidic hypochlorite sodium has also been used with axenic animal (Niimi et al., 2019).

To avoid accidental contamination of the animals when cages are open, several measures can be taken to reduce the quantity of microorganisms in rooms where axenic animals are housed. Personal protection equipment like medical gloves, hair covers, disposable isolation gown, and disposable shoe cover have been reported by the cage level isolator users (Lange et al., 2019; Niimi and Takahashi, 2019; Paik et al., 2015). Face protection equipment tends to vary. The use of N95 FFRs (Lange et al., 2019), a face mask (Niimi et al., 2019) half mask with 3M cartridges (Paik et al., 2015) have been reported. Other measures include room fumigation with hydrogen peroxide (Andersen et al., 2006), surface cleaning with chemical disinfectants such as Oxivir® Plus (Diversey™, Fort Mill, SC, USA) and Virkon™ (Vetoquinol) (Alfa et al., 2010; Hornig et al., 2016), the use of an antechamber at the chamber entrance, and disinfection or sterilization of all material entering rooms where axenic animals are housed. All these measures are expensive and time consuming, and therefore not applied in all facilities. However, since there is no data about the quantity and diversity of

microorganisms in axenic or non-axenic rooms, there is no comparable data to evaluate the effectiveness of the measures used to control them.

Rigorous quality assurance (QA) procedures are essential to define the axenic status of an environment as well as the animal(s) it hosts. Even though there is no consensus on QA methods, the techniques most often applied on axenic animal samples (faeces, food, water, bedding, etc.) is culture on non-selective media and 16S molecular biology techniques for detection of unculturable and slow growing bacteria. QA can be cost prohibitive, and therefore the choice of which samples to collect and the type and frequency of QA control applications should be adapted based on protocol needs and on cost-benefit analysis of the particular project.

The first aim of this study was to compare the microbial load and diversity found on Isocages hosted in our axenic facility with cages hosted in a typical specific pathogen-free (SPF) facility in order to evaluate the effectiveness of microbial reduction measures in axenic rooms. An overview of the types of microorganisms that naturally colonize the surface of Isocages after two weeks stay was also obtained, representing the average amount of time between two cage changes were mice are transferred into a clean new cage. The second aim of the study was to optimize the disinfection protocol for immersion tank soaking. The log reduction of *Bacillus atrophaeus* spores, used as a contamination marker in this experiment, in function of soaking time was measured for Virkon™ (10% m/v, Vetoquinol, Lavaltrie, Quebec, Canada) and three different concentrations (50 ppm, 75 ppm and 100 ppm) of MB-10.

## **1.5 : Materials and methods**

### **1.5.1 : Animal facility infrastructure and precautions**

#### *1.5.1.1 : Axenic room*

The axenic facility described in the study was inaugurated in 2017 and is exclusively used for axenic experimentations. It contained a full rack of 30 Isocages and an IBS. The disinfectant dunk tank was supplied with a 200 ppm MB-10 solution (Quip Laboratories).

All the incoming and outgoing materials, such as clean and soiled Isocages and boxes containing the culture media for microbial screening, must pass through the dunk tank for a 5-minute disinfection (recommended by the IBS supplier) to avoid the perturbation of the laminar airflow (outgoing items do not need to be disinfected). The IBS working surface and gloves were disinfected with a 200 ppm MB-10 (Quip Laboratories, concentration recommended by the IBS supplier) spray solution between each handling. An average of 20 cages were changed each day for a total of 100 cage changes per week. The IBS was fumigated with hydrogen peroxide vapour using 30% hydrogen peroxide (J. T. Baker®, Avantor®, Radnor Township, PA, USA) and Bioquell L-4 (Bioquell, Horsham, PA, USA) following Bioquell protocol for 3h after each use. Fumigation process was confirmed with  $10^6$  *Geobacillus stearothermophilus* spore biological indicators (HPV-BI, Bioquell). The room is fumigated with hydrogen peroxide vapour using Bioquell L-4 and controls for 6h, every two to three months and has an antechamber used for material and staff preparation. When handling animals for reasons such as cage changes, staff were required to wash hands and then put on medical gloves, a hair cover, a coverall suit, a full-face chemical cartridge mask (Powered air-purifying respirator, 3M Health Care, Saint Paul, MN, USA), clean slippers and a second pair of gloves, all before entering the room. For daily animal observations, the coverall suit and full-face chemical cartridge mask were exchanged for a single-use medical jacket and N95 FFR (3M Health Care).

#### *1.5.1.2 :SPF Non-axenic room*

The non-axenic facility described in the study was inaugurated in 2010. It contains DVC Racks® and GM500® cages (both from Tecniplast®) which are positive pressure cages (like the Isocage hosting axenic animals). The room was equipped with an ARIA CS48® station (Tecniplast®) for cage changing and animal handling. All the incoming materials and the station surface were disinfected with a 1:40 hydrogen peroxide solution (Oxivir® Plus, Diversey™). The gloves were disinfected with the same Oxivir® Plus (Diversey™) spray solution between each cage handling and the entire room was disinfected every six months with a 1:128 Oxivir® solution (Diversey™). For daily use and handling animals, the users were required to first wash hands before donning medical gloves, a hair cover, a disposable isolation gown, clean disposable shoe cover, an N95 filtering face piece respirator (FFR) and

a second pair of gloves before they could enter the room. This facility was chosen because its materials and infrastructure were similar to the axenic room and was used as a normal non-axenic room reference.

### **1.5.2 : Microbial quantification and biodiversity**

Fumigation is performed every 2-3 months in our axenic room as a standard procedure. The sampling campaign starts two weeks after a fumigation and last over two months from July to August 2018. Samples from the axenic room were obtained by swabbing randomly one of the exterior surfaces (between the sides, the top or the front) of 10 to 22 random cages once a week for six weeks (for a total of 107 Tecniplast<sup>®</sup> Isocages samples) with a sterile swab (handled with sterile forceps) sterilized in a 4 mL tube of Bacto<sup>™</sup> Brain Heart Infusion (BHI, BD, Sparks, MD, USA) broth. A 10 cm x 10 cm plexiglass template was used to accurately sample 100 cm<sup>2</sup>. The sampling material was vaporized with 70% (v/v) ethanol solution between each sampling of the cages until the disinfectant has completely evaporated. A negative control was obtained each sampling day by inoculating the BHI broth with a sterile swab. Negative controls for the filtration system and plating protocols were also obtained. The non-axenic samples were obtained by swabbing the surfaces of 18 to 19 random cages (for a total of 109 GM500 Tecniplast<sup>®</sup> cages), containing non-axenic mice from the same amount of time as the axenic cages, once a week for six weeks using the same procedure. This sampling campaign took place a year after the axenic one from July to August 2019. The sampling protocol for both treatments immediately after swabbing is shown in Figure 5. Briefly, swabs were put back in the 4mL BHI tubes and samples were then routed to the laboratory where broths were vortexed for 15 s and two aliquots of 100 µL were plated on two Bacto<sup>™</sup> Brain Heart Infusion Agar (BHIA, BD, Sparks, MD, USA). Both plates were incubated for 7 days at 30°C (to allow slow growing microorganisms, environmental bacteria and fungi as well as microorganisms from human and animal flora), one in aerobic conditions and the other in anaerobic conditions. The remaining liquid was filtered on a 22 µm filter using a fritted glass filtration funnel and this last subsample was placed on BHIA. The plate was incubated for 7 days at 30°C in aerobic conditions. All the colony-forming unit (CFU) obtained from all conditions and rooms were then counted. Since all cages from both axenic



and non-axenic rooms were disinfected two weeks before the sampling campaign (before their entrance in the IBS when a cage changing occurred), no culturable microbes would be expected as the initial concentration. All the recovered colonies from the axenic room and approximately five to six colonies from the non-axenic room (chosen randomly) per sampling day were identified using 16S gene sequencing as follows.

DNA extraction of the selected colonies was completed using a Whatman™FTA™ Classic Card as recommended by the supplier (GE Healthcare Life Science, now called Cytiva, Marlborough, MA, USA). The Mastermix for each endpoint PCR reaction contained : 5 µL of 5X Green GoTaq Flexi buffer, 1 µL of dNTP mix, 3 µL of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µL of GoTaq Flexi Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) and a mix of 50 mM of universal 16s RNA primers 63F (5'-CGGCCTAACACATGCAAGTC-3') and 1387R (5'-GGCGGWGTGTACAAGGC-3')(Marchesi et al., 1998). Five punches from FTA™ cards were incorporated into the final 50 µL reaction. The thermocycler amplification (DYAD Peltier thermal cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) consisted of 40 cycles: 94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, 72°C for 90 sec, and then a final cycle at 72°C for 5 minutes. Bacteria were identified using Sanger sequencing with the same primers that were used for the endpoint PCR. The isolated fungi were identified to genus level using optical microscopy with methyl blue stain. All microorganisms with capacity of forming spores were considered to be in spore form to establish the target number of spores to kill with disinfection treatment (worst case scenario). The number of spores per cm<sup>2</sup> was used to estimate the total number of spores per cage since a cage surface is 3076 cm<sup>2</sup>.

The correlation between the microbial quantification data points from each room was evaluated using a Pearson R test. The effectiveness of the precautionary measures performed in the axenic room was obtained by comparing the microbial diminution between the two room types.

### **1.5.3 : Disinfection tests using surrogates**

*Bacillus atrophaeus* spores (GenBank sequence ID: MN826517.1) were purified on a sodium bromide gradient, as published elsewhere (Laflamme et al., 2005), with a concentration

adjusted to  $5 \times 10^5$  spores/mL as determined using optical microscopy. *B. atrophaeus* was chosen because it is used as biological indicators for sterilization or disinfection (Sella et al., 2015). One hundred microlitres of the spore suspension was added to 4 mL of disinfectant. A 10% (m/v) Virkon™ solution (Vetoquinol) and three concentrations of MB-10 (100 ppm, 75 ppm and 50 ppm) were tested. A 100 µL sample was immediately pipetted into 900 µL of the neutralizing solution corresponding to time 0 ( $t_0$ ) (For MB-10 and QLI Neutralizer Powder, Quip Laboratories) diluted in sterile water for a final concentration of 14 g/L; for Virkon™ (Vetoquinol), a solution made of 1% (m/v) Sodium bicarbonate (Wisent Bioproducts, St-Bruno, QC, Canada) and 25 g/L of Sodium thiosulfate (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). The same protocol was performed for 1, 2, 3, 4 and 5 minute-long ( $t_1$  to  $t_5$ ) treatments. Longer immersion times were not tested because it would exceed the animal comfort time without cage ventilation. Dilutions were performed serially and 100 µL were plated on Trypticase soy agar (TSA, BD) in triplicate. The experiment was repeated three times for MB-10 (Quip Laboratories) and once for Virkon™ (Vetoquinol). A “no-disinfectant” control (the same experiment was performed but the disinfectant was replaced by sterile water) and a negative control (only sterile water) were performed for each experiment. The same experiment was performed using a  $5 \times 10^5$  *Staphylococcus epidermidis* per mL solution, but using exclusively the 100 ppm MB-10 concentration. Statistical analyses (2-WAY ANOVA) were performed using GraphPad software version 8.0 (La Jolla, CA, USA).

#### **1.5.4 : Determination of log reduction target, disinfectant concentration and soaking time**

Five minutes is the maximum cage soaking time for animal well-being because when dunk tank is filling, soaking, and purging cages are not ventilated. Moreover, the shorter the soaking time is the better with regard of work burden. Given that a standard disinfection of 6 log spores reduction cannot be achieved in 5 minutes soaking time (or less) in disinfectant, an arbitrary and acceptable level of risk of microbial contamination must be determined. As an example, an animal facility that performs 100 cage changes per week in a single hood might decide that one remaining spore per week is an acceptable risk (1 spore/100 cages,  $n$ ).

Knowing the average number of spore-forming microorganisms per cage ( $\alpha$ ) in an axenic room (determined in the previous section and assuming that all spore-forming microorganisms are in their spore form) allows for the calculation of the target log reduction ( $x$ ) that is required for the acceptable risk level that was decided upon (Formula 1).

Formula 1 : Log Factor Reduction

$$x < -\text{Log}_{10} \left( \frac{n}{\alpha} \right)$$

The immersion time required to reach the targeted log reduction ( $x$ ) with every disinfectant concentration tested can be obtained using a chart of bacterial concentration in function of soaking time (Figure 7) created from the disinfection test results. In theory, any time longer than the time required to reach  $x$  will be enough to achieve and surpass the targeted level of risk previously chosen. Equations extrapolated from data on the chart of bacterial concentration in function of soaking time can be used to calculate the soaking time required to reach 6 log reduction. However, the disinfectant concentration and contact time must also consider the burden of work for staff to perform the necessary handling and procedures as well as their personal safety and animal comfort, and therefore reaching 6 log of spore reduction might not be feasible.

## 1.6 : Results

### 1.6.1 : Microbial quantification and biodiversity on axenic and non-axenic cages

A total of 94 colonies were isolated from the 107 samples collected from the surfaces of axenic cages (93 bacteria, 1 fungus). There was no colony associated with any of the negative controls. The genera identified either by 16S sequencing or microscopy (fungus) are presented in Table 4. The most common bacterial genus was *Staphylococcus* (56 colonies) followed by *Dermaococcus* (9 colonies), *Bacillus* (7 colonies) and *Micrococcus* (7 colonies). An average of 8.90E-03 CFU/cm<sup>2</sup> (colony-forming unit) was found on cage surfaces,

including  $1.34\text{E-}03$  CFU/cm<sup>2</sup> of spore-forming microorganisms. That based on a swabbed surface of 100 cm<sup>2</sup> and a total cage surface of 10 700 cm<sup>2</sup>, there was an average of 20 culturable microorganisms per cage, including three spore-forming microorganisms.

There were 95,209 CFU counted from samples collected in the non-axenic room. Since all colonies could not be identified from non-axenic room samples, they were chosen randomly to facilitate the determination of their frequency in the samples. Among these, 340 colonies (337 bacteria and 3 fungi) were identified using 16S sequencing (representing 0.4% of the isolated bacteria) for bacteria and blue cotton stain and microscopy for the fungi. The most common bacterial genera were *Staphylococcus* (41.8%), *Bacillus* (22.6%), and *Sporosarcina* (16.6%) (Table 5). The microbial concentration on the non-axenic cages was 8.81 CFU/cm<sup>2</sup>. This represents  $1.98\text{E}+4$  CFU ( $\pm 2.1\text{E}+01$ ) per cage, including at least 29 CFU with spore-forming capacity. The results of the non-axenic room are presented as percentages since only a portion of the total counted microorganisms have been identified.

The comparison of quantified organisms between the non-axenic room (95,209 CFU) and the axenic room (94 CFU) yielded a significant 3 Log (10) difference (Pearson R coefficient between 1.000 and 0.970), as revealed by a statistical Pearson correlation coefficient test based on covariance.

Figure 6 presents the microbial diversity (proportion of each genus) obtained from the axenic and non-axenic rooms. Only the five most common genera from each room are presented. The remainder are pooled in the “Others” category. *Staphylococcus* was the most common genus observed in both room types.

### **1.6.2 : Determination of required immersion time**

The effect of soaking time on *B. atrophaeus* spores and *S. epidermidis* (Figure 7) was measured. The effectiveness of the neutralization processes was confirmed by a non-significant difference observed between the disinfectant and positive control at time 0 ( $t_0$ ) with *B. atrophaeus* spores. It was estimated that this handling time was less than 20 seconds. With *S. epidermidis*, this 20 seconds handling time required to perform time 0 (add bacteria

in disinfectant, add neutralizer, mix, and plate) was too long to allow any measurement. No colony was obtained on time 0. No colony was isolated from the negative controls.

As illustrated in Figure 7, the number of surviving spores correlates with immersion time. The longer the immersion time, the fewer surviving spores remained. The D Value (1 log reduction) was calculated based on results presented on Figure 7. D value was 138 sec in 100 ppm MB-10, 144 sec in 75 ppm MB-10, 147 sec in 50 ppm MB-10 and 290 sec in Virkon™ at 21°C (room temperature) for *B. atrophaeus* spores. In five minutes soaking time, the log reduction of *B. atrophaeus* spores were 4.46, 3.45, 3.47, and 1.66 in MB-10 100ppm, MB-10 75 ppm, MB-10 50 ppm, and Virkon 10% respectively.

With *S. epidermidis*, since the count levels falling below the level of enumeration with 100 ppm MB-10, the D value is below 20 seconds (handling time), but cannot be calculated precisely. Soaking times required to reach 6 log reduction *B. atrophaeus* spores are displayed in Table 6. However, these soaking times exceed 5 minutes maximal time for animal comfort. Therefore, an acceptable level of risk should be established since sterilization levels cannot be reached in an acceptable time. Since 100 cages are changed per week, the acceptable risk was established at less than one *Bacillus* spore per week.

Given the acceptable risk ( $n$ ) for our axenic animal facility is 1 spore/100 cages and the quantity of spores per cage ( $\alpha = 3$  spores/cages) is known, the target log reduction is 2.5 (Formula 1). The immersion time associated with a 2.5 log reduction (Figure 7) was 293 sec in 50 ppm MB-10, 292 sec for 75 ppm MB-10, and 246 sec for 100 ppm MB-10. The 10% Virkon™ solution provides 1 log reduction of *B. atrophaeus* spores in 270 seconds, and therefore was not considered efficient enough.

## **1.7 : Discussion**

### **1.7.1 : Microbial quantification and biodiversity on axenic and non-axenic cages**

An average quantity of 8.90E-03 CFU per cm<sup>2</sup> on cages in axenic rooms was detected. That average is 1000 times lower than that for cages in the non-axenic room. Most of the

microorganisms identified on axenic cages (*Staphylococcus*, *Dermacoccus*, *Micrococcus*) are associated with human skin (Bergey et al., 1984; Coates et al., 2013) and are abundantly present in humans surrounding areas. Other genera that were found are ubiquitous in many environments, such as soil and water (*Bacillus*, *Microbacteria*, *Kocuria*, *Actinomyces*, *Penicillium*). These microorganisms can be introduced into an animal facility from bioaerosols through wind flow or ventilation as well as from clothing, litter and other animal facility supplies. According to previous publications, microorganisms associated with technicians and other animals contained in the animal facility, microorganisms present in the laboratory during sample processing and material preparation and finally, microorganisms survivors of non-efficient sterilization are the most probable axenic mice contaminant sources (Basic and Bleich, 2019; Fontaine et al., 2015; Schoeb et al., 2017) . The observed microorganisms herein confirm this hypothesis.

Similar to the axenic room, the most abundant genus in the non-axenic room was also *Staphylococcus*. However, the proportion of environmentally related bacteria (*Bacillus*, *Sporosarcina*, *Microbacterium*, *Atopostipes*, *Kocuria*, *Jeotgalicoccus*, etc.) was 52.9% compared to the 23.4% observed in the axenic room samples (proportions illustrated in Figure 6). Both rooms contained common genera like *Microbacteria*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Dermacoccus* and *Bacillus*.

### **1.7.2 : Disinfection tests**

Since *Staphylococcus* was the most frequently identified microbe in both types of rooms (AR and NAR), and given the high resistance of spore-forming bacteria, they both represent interesting markers of contamination in axenic animal facilities.

Virkon supplier is recommending concentration ranging from 0.5 to 2%, but concentrations up to 4% have been tested in literature. It has been reported that the time to kill is shortened with increasing concentration. Gasparini and collaborators (Gasparini et al., 1995) reported 0.4 log reduction of *Bacillus* spores in five minutes using Virkon 2%. We therefore decided to incise the concentration to 10%, hoping for better effect. Our result of 1.66 log reduction

of *B. atrophaeus* spores after five minutes in Virkon 10% is consistent with the results published by Gasparini et al., 1995.

The results obtained in this study with *B. atrophaeus* spores in MB-10 are in accordance with those obtained by Kreske and collaborators (Kreske et al., 2006) with various *Bacillus* types of spores. Indeed, these authors obtained between 2.73 (*B. thuringiensis*) and 4.97 (*B. cereus* F4616A/90) log reduction in 5 minutes contact time with 75 ppm chlorine dioxide. In our study, with 75 ppm MB-10, we obtained 3.45 log reduction of *B. atrophaeus* spores after 5 minutes in 75 ppm MB-10.

Since no *S. epidermidis* CFU was recovered in time 0 of our experiment (estimated to be 20 sec handling before plating), the log reduction of MB-10 on *S. epidermidis* cannot be calculated. This result is in accordance with those obtained by Hinenoya et al., 2015, who recovered no culturable *S. aureus* after 15 seconds incubations in 100 ppm chlorine dioxide (Hinenoya et al., 2015). With an estimated D value below 20 seconds, a 6 log reduction of *S. epidermidis* in less than 2 minutes in 100 ppm MB-10 can be expected. Since only 20 CFU per cage were founded in AR, this reached disinfection level is adequate. However, this level of disinfection cannot be reached in 5 minutes soaking time with *B. atrophaeus* spores but the level reached is compatible with the expected contamination load. Therefore, an acceptable level of risk must be determined considering bacterial load, personnel safety, equipment integrity, animal comfort, cost, and handling time.

Adjusting the chemical disinfection immersion time with the lowest concentration of disinfectant has several advantages. It extends the integrity of the animal facility infrastructure, lowers the costs associated with the disinfectant and reduces staff exposure. The target reduction is 2.5 log and can be reached within 246 seconds of immersion in 100 ppm MB-10. *B. atrophaeus* spores 2.5 log reduction couldn't be obtained with Virkon™ in less than 5 minutes.

## **1.8 : Conclusion**

Significantly lower microbial load was found in the axenic room surfaces compared to the non-axenic room and confirms the effectiveness of the axenic room's precautionary measures to keep bacterial burden low. Microbial diversity results showed that *Staphylococcus* was the most frequently observed genus in both room types. An average of three spore-forming microorganisms per cage was detected from the axenic room samples. The optimal soaking time was 246 seconds in 100 ppm MB-10 to reach the targeted 2.5 log reduction for *B. atrophaeus* spores. These results allow researchers to adapt their procedures to their specific risk tolerance and protocol requirements. However, microbial load should be determined for each axenic animal facility to be sure that the disinfection time is suitable for that specific setting. In addition, inclusive methods such as ATP measurement and fluorescence staining which can detect spores could be evaluated in the context of contamination evaluation prior to disinfection protocols applications (La Duc et al., 2007; Schichnes et al., 2006; Yoshihito et al., 2004).

## **1.9 : Acknowledgements**

Thanks to Alexandre Pleau and Joanie Drolet for collecting samples from axenic and non-axenic rooms and providing the relevant information regarding the operations of normal animal facilities. Thanks also to Joanie Lemieux, Charles-André Roux and Nathan Dumont-Leblond for their help with the disinfection test plating.



## 1.10 : References

- Alfa, M.J., E. Lo, A. Wald, C. Dueck, P. DeGagne, and G.K.M. Harding. 2010. Improved eradication of *Clostridium difficile* spores from toilets of hospitalized patients using an accelerated hydrogen peroxide as the cleaning agent. *BMC Infect. Dis.* 10:9.
- Andersen, B.M., M. Rasch, K. Hochlin, F.H. Jensen, P. Wismar, and J.E. Fredriksen. 2006. Decontamination of rooms, medical equipment and ambulances using an aerosol of hydrogen peroxide disinfectant. *J. Hosp. Infect.* 62:149-155.
- Backhed, F., H. Ding, T. Wang, L.V. Hooper, G.Y. Koh, A. Nagy, C.F. Semenkovich, and J.I. Gordon. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:15718-15723.
- Basic, M., and A. Bleich. 2019. Gnotobiotics: Past, present and future. *Lab. Anim.* 53:232-243.
- Bayer, F., S. Ascher, G. Pontarollo, and C. Reinhardt. 2019. Antibiotic treatment protocols and germ-free mouse models in vascular research. *Front. Immunol.* 10:7.
- Belkaid, Y., and T.W. Hand. 2014. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 157:121-141.
- Bergey, D.H., N.R. Krieg, and J.G. Holt. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Catanzaro, R., M.G. Anzalone, F. Calabrese, M. Milazzo, M.L. Capuana, A. Italia, S. Occhipinti, and F. Marotta. 2015. The gut microbiota and its correlations with the central nervous system disorders. *Panminerva Medica.* 57:127-143.
- Coates, R., J. Moran, and M.J. Horsburgh. 2013. Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. *Future Microbiology.* 9:75-91.
- Fontaine, C.A., A.M. Skorupski, C.J. Vowles, N.E. Anderson, S.A. Poe, and K.A. Eaton. 2015. How free of germs is germ-free? Detection of bacterial contamination in a germ free mouse unit. *Gut microbes.* 6:225-233.

Gasparini, R., T. Pozzi, R. Magnelli, D. Fatighenti, E. Giotti, G. Poliseo, M. Pratelli, R. Severini, P. Bonanni, and L. De Feo. 1995. Evaluation of in vitro efficacy of the disinfectant Virkon. *European Journal of Epidemiology*. 11:193-197.

Hecht, G., C. Bar-Nathan, G. Milite, I. Alon, Y. Moshe, L. Greenfeld, N. Dotsenko, J. Suez, M. Levy, C.A. Thaiss, H. Dafni, E. Elinav, and A. Harmelin. 2014. A simple cage-autonomous method for the maintenance of the barrier status of germ-free mice during experimentation. *Lab. Anim.* 48:292-297.

Hinenoya, A., S.P. Awasthi, N. Yasuda, A. Shima, H. Morino, T. Koizumi, T. Fukuda, T. Miura, T. Shibata, and S. Yamasaki. 2015. Chlorine dioxide is a better disinfectant than sodium hypochlorite against multi-drug resistant staphylococcus aureus, pseudomonas aeruginosa, and acinetobacter baumannii. *Japanese journal of infectious diseases*. 68:276-279.

Hornig, K.J., B.A. Burgess, N.T. Saklou, V. Johnson, A. Malmlov, D.C. Van Metre, P.S. Morley, and S.R. Byers. 2016. Evaluation of the efficacy of disinfectant footmats for the reduction of bacterial contamination on footwear in a large animal veterinary hospital. *J. Vet. Intern. Med.* 30:1882-1886.

Iida, N., A. Dzutsev, C.A. Stewart, L. Smith, N. Bouladoux, R.A. Weingarten, D.A. Molina, R. Salcedo, T. Back, S. Cramer, R.M. Dai, H. Kiu, M. Cardone, S. Naik, A.K. Patri, E. Wang, F.M. Marincola, K.M. Frank, Y. Belkaid, G. Trinchieri, and R.S. Goldszmid. 2013. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science*. 342:967-970.

Jiang, C.M., P.R. Huang, Z. Liu, and B. Zhao. 2017. The gut microbiota and alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 58:1-15.

Kamada, N., S.-U. Seo, G.Y. Chen, and G. Núñez. 2013. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*. 13:321.

Karbach, S.H., T. Schonfelder, I. Brandao, E. Wilms, N. Hormann, S. Jackel, R. Schuler, S. Finger, M. Knorr, J. Lagrange, M. Brandt, A. Waisman, S. Kossmann, K. Schafer, T. Munzel, C. Reinhardt, and P. Wenzel. 2016. Gut microbiota promote angiotensin ii-induced arterial hypertension and vascular dysfunction. *J. Am. Heart Assoc.* 5:15.

Kreske, A.C., J.H. Ryu, and L.R. Beuchat. 2006. Evaluation of chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer for effectiveness in killing *Bacillus cereus* and *Bacillus*

thuringiensis spores in suspensions, on the surface of stainless steel, and on apples. *Journal of food protection*. 69:1892-1903.

La Duc, M.T., A. Dekas, S. Osman, C. Moissl, D. Newcombe, and K. Venkateswaran. 2007. Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:2600-2611.

Laflamme, C., J. Ho, M. Veillette, M.C. de Latremoille, D. Verreault, A. Meriaux, and C. Duchaine. 2005. Flow cytometry analysis of germinating *Bacillus* spores, using membrane potential dye. *Arch. Microbiol.* 183:107-112.

Lange, M.E., R.R.E. Uwiera, and G.D. Inglis. 2019. Housing gnotobiotic mice in conventional animal facilities. *Current protocols in mouse biology*. 9:e59.

Marchesi, J.R., T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom, and W.G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:795-799.

Moody, L.V., Y. Miyamoto, J. Ang, P.J. Richter, and L. Eckmann. 2019. Evaluation of peroxides and chlorine oxides as disinfectants for chemical sterilization of gnotobiotic rodent isolators. *J. Amer. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 58:558-568.

Niimi, K., P. Hardy, B. Bilecki, and E. Takahashi. 2019. Rearing and breeding of germ-free mice for over 1 year in a sealed positive pressure cage system. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 67:119-125.

Niimi, K., and E. Takahashi. 2019. New system to examine the activity and water and food intake of germ-free mice in a sealed positive-pressure cage. *Heliyon*. 5:e02176.

Nuttall George, H.F., and H. Thierfelder. 1897. Thierisches leben ohne bakterien im verdauungskanal. In Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie. Vol. 23. 231.

Paik, J., O. Pershutkina, S. Meeker, J.J. Yi, S. Dowling, C. Hsu, A.M. Hajjar, L. Maggio-Price, and D.A. Beck. 2015. Potential for using a hermetically-sealed, positive-pressured isocage system for studies involving germ-free mice outside a flexible-film isolator. *Gut microbes*. 6:255-265.

Parashar, A., and M. Udayabanu. 2017. Gut microbiota: implications in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. 38:1-7.

Ridaura, V.K., J.J. Faith, F.E. Rey, J.Y. Cheng, A.E. Duncan, A.L. Kau, N.W. Griffin, V. Lombard, B. Henrissat, J.R. Bain, M.J. Muehlbauer, O. Ilkayeva, C.F. Semenkovich, K. Funai, D.K. Hayashi, B.J. Lyle, M.C. Martini, L.K. Ursell, J.C. Clemente, W. Van Treuren, W.A. Walters, R. Knight, C.B. Newgard, A.C. Heath, and J.I. Gordon. 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 341:1079-U1049.

Schichnes, D., J. Nemson, and S. Ruzin. 2006. Fluorescent staining method for bacterial endospores. *Microscope*. 54.

Schoeb, T.R., and R.P. Orcutt. 2017. Chapter 1 - historical overview. *In* Gnotobiotics. T.R. Schoeb and K.A. Eaton, editors. Academic Press. 1-19.

Schoeb, T.R., R.J. Rahija, C. Boyd, R.P. Orcutt, and K.A. Eaton. 2017. Chapter 2 - principles of establishing and operating a gnotobiotic facility. *In* Gnotobiotics. T.R. Schoeb and K.A. Eaton, editors. Academic Press. 21-63.

Schwabe, R.F., and C. Jobin. 2013. The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 13:800-812.

Sella, S.R., L.P. Vandenberghe, and C.R. Soccol. 2015. *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications - a review. *Critical reviews in biotechnology*. 35:533-545.

Sommer, F., and F. Backhed. 2013. The gut microbiota - masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:227-238.

Thaiss, C.A., N. Zmora, M. Levy, and E. Elinav. 2016. The microbiome and innate immunity. *Nature*. 535:65.

Tlaskalova-Hogenova, H., R. Stepankova, H. Kozakova, T. Hudcovic, L. Vannucci, L. Tuckova, P. Rossmann, T. Hrnecir, M. Kverka, Z. Zakostelska, K. Klimesova, J. Pribylova, J. Bartova, D. Sanchez, P. Fundova, D. Borovska, D. Srutkova, Z. Zidek, M. Schwarzer, P. Drastich, and D.P. Funda. 2011. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell. Mol. Immunol.* 8:110-120.

Wang, Z.N., E. Klipfell, B.J. Bennett, R. Koeth, B.S. Levison, B. Dugar, A.E. Feldstein, E.B. Britt, X.M. Fu, Y.M. Chung, Y.P. Wu, P. Schauer, J.D. Smith, H. Allayee, W.H.W. Tang, J.A. DiDonato,

A.J. Lusa, and S.L. Hazen. 2011. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 472:57-U82.

Yoshihito, F., K. Mieko, M. Koji, S. Hiroyuki, I. Teruo, T. Kouichiro, and S. Yasuo. 2004. Sensitive detection of bacteria and spores using a portable bioluminescence atp measurement assay system distinguishing from white powder materials. *Journal of Health Science*. 50:126-132.

## 1.11 : Tables

Table 4 : Total aerobic and anaerobic microbial diversity on cages from axenic room and probable sources

<b>Genera</b>	<b>Quantity</b>	<b>Spore-Forming</b>	<b>Most probable source</b>
<i>Staphylococcus</i>	56	No	Human skin
<i>Dermacoccus</i>	9	No	Human Skin
<i>Bacillus</i>	7	Yes	Environment/Mammalian intestinal tract
<i>Micrococcus</i>	7	No	Human skin
<i>Actinomyces</i>	2	Yes	Environment
<i>Kocuria</i>	2	No	Environment
<i>Microbacterium</i>	2	No	Environment
<i>Acinetobacter</i>	1	No	Environment
<i>Brevibacterium</i>	1	No	Environment
<i>Calidifontibacter</i>	1	No	Environment
<i>Dietzia</i>	1	No	Environment
<i>Domibacillus</i>	1	Yes	Environment
<i>Kroppenstedtia</i>	1	Yes	Environment/Mammalian intestinal tract
<i>Noviherbaspirillum</i>	1	No	Environment
<i>Ornithinibacillus</i>	1	Yes	Environment
<i>Penicillium</i>	1	Yes	Environment
<b>Total</b>	<b>94</b>	<b>13</b>	-

Table 5 : Total aerobic and anaerobic microbial diversity on cages from non-axenic room and probable sources

Microorganism	Quantity	Spore-Forming	Most probable source
<i>Staphylococcus</i>	141	No	Human skin
<i>Bacillus</i>	76	Yes	Environment/Mammalian intestinal tract
<i>Sporosarcina</i>	56	Yes	Environment
<i>Microbacterium</i>	9	No	Environment
<i>Micrococcus</i>	8	No	Human skin
<i>Dermacoccus</i>	7	No	Human skin
<i>Atopostipes</i>	6	No	Environment
<i>Enterococcus</i>	6	No	Mammalian intestinal tract
<i>Kocuria</i>	4	No	Environment
<i>Jeotgalicoccus</i>	3	No	Environment
<i>Paenibacillus</i>	3	Yes	Environment
<i>Arsenicicoccus</i>	2	No	Environment
<i>Lactococcus</i>	2	No	Mouse intestinal tract
<i>Penicillium</i>	2	Yes	Environment
<i>Planomicrobium</i>	2	No	Environment
<i>Rhodococcus</i>	2	No	Environment
<i>Stenotrophomonas</i>	2	No	Environment
<i>Aspergillus</i>	1	Yes	Environment
<i>Brevibacterium</i>	1	No	Environment
<i>Corynebacterium</i>	1	No	Environment/Human skin
<i>Kroppenstedtia</i>	1	Yes	Environment/Mammalian intestinal tract
<i>Ornithinibacillus</i>	1	Yes	Environment
<i>Saccharopolyspora</i>	1	Yes	Environment
<i>Solibacillus</i>	1	Yes	Environment
<i>Sphingomonas</i>	1	No	Environment
<i>Streptococcus</i>	1	No	Human Skin
<b>Total</b>	<b>340</b>	<b>147</b>	-

Table 6 : Soaking time required to reach 6 log reduction of *B. atrophaeus* spores in all disinfectant solution

Disinfectant solution	Extrapolate soaking time <sup>1</sup>
MB-10 100ppm	7 minutes 35 sec
MB-10 75ppm	9 minutes 39 sec
MB-10 50ppm	9 minutes 37 sec
Virkon 10%	20 minutes

1) Soaking time extrapolate from curves equations of data displayed on Figure 7.

## 1.12 : Figures

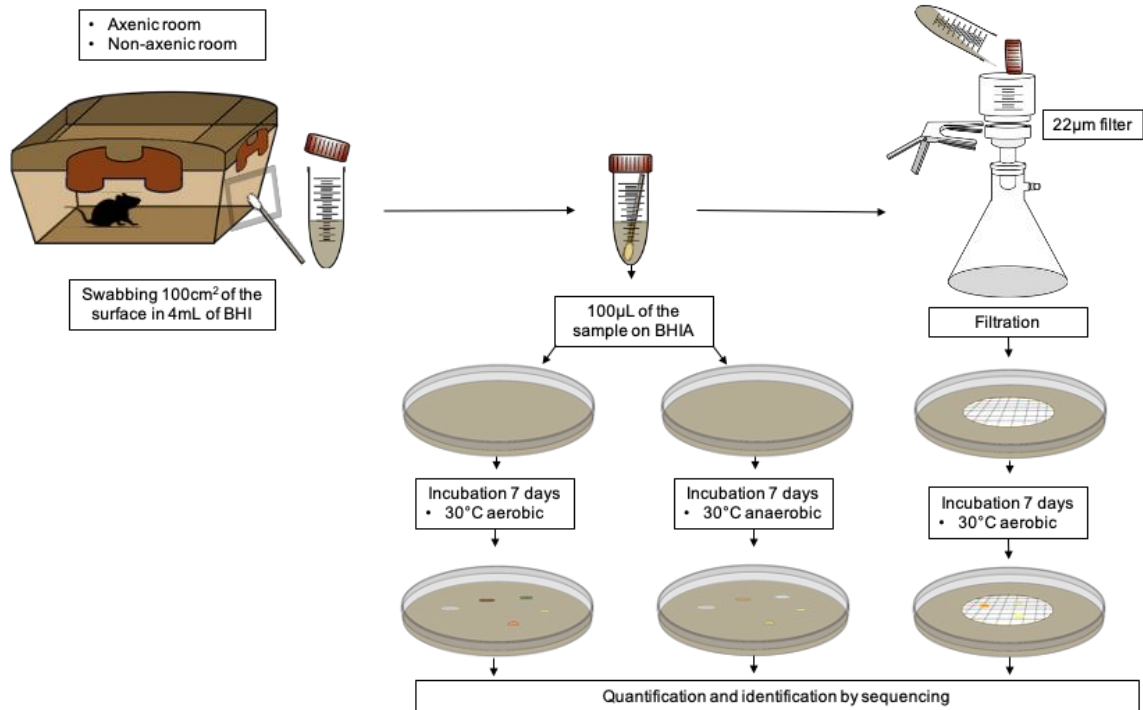


Figure 5 : Sampling and sample treatment for quantification and biodiversity measures

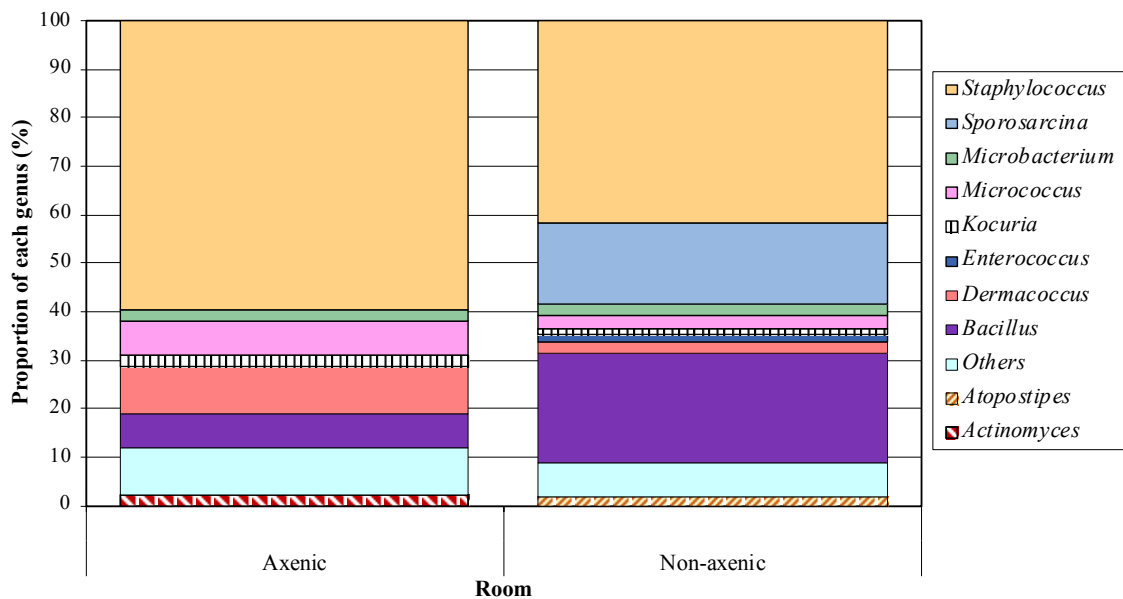


Figure 6 : Proportion of each identified genus according to room type



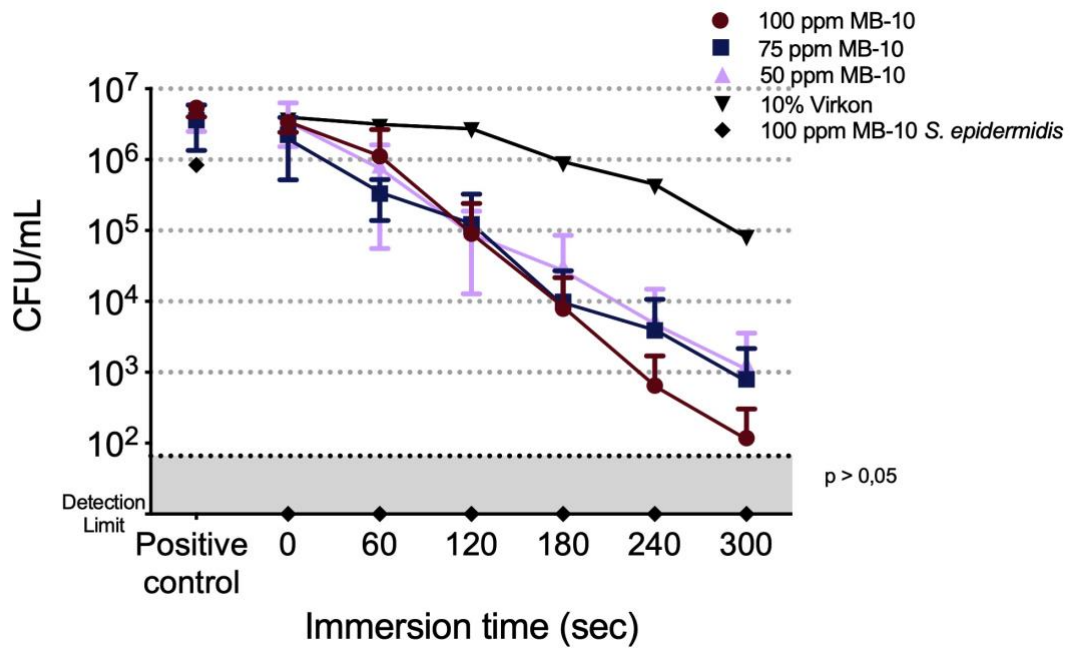


Figure 7 : Survival effect of *B. atrophaeus* spores and *Staphylococcus epidermidis* with MB-10 and 10% Virkon over time

## **Chapitre 2 : Déterminer l'efficacité des méthodes à détecter des contaminants microbiens en condition axénique. Article – Contaminants and Where to Find Them : Microbiological Quality Control in Axenic Animal Facilities.**

Article soumis dans la revue *Gut Microbes* le 10 décembre 2020 sous le numéro de manuscrit 200878432. Puisque la publication n'a pas été acceptée sous cette forme, il sera soumis après édition dans un autre journal en temps opportun.

### **Authors :**

Maria Lebeuf<sup>1</sup>, Nathalie Turgeon<sup>2</sup>, Cynthia Faubert<sup>2</sup>, Alexandre Pleau<sup>2</sup>, Justin Robillard<sup>2</sup>,  
Éric Paradis<sup>2</sup>, André Marette<sup>2-4</sup>, Caroline Duchaine<sup>1-2,5</sup>

### **Affiliations :**

- 1) Département de biochimie, microbiologie et bioinformatique, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada.
- 2) Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Quebec City, Quebec, Canada.
- 3) Département de médecine, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada.
- 4) Pfizer Canada – CIHR Chair in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Cardiovascular Diseases, Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Quebec City, Quebec, Canada.
- 5) Tier-1 Canada Research Chair on Bioaerosols, Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Quebec City, Quebec, Canada.

### **Corresponding author :**

Professor Caroline Duchaine, Institut Universitaire de cardiologie et pneumologie de Québec - Université Laval, Bureau A2128, 2725 ch Ste-Foy, Québec, QC, Canada, G1V 4G5 or email [caroline.duchaine@bcm.ulaval.ca](mailto:caroline.duchaine@bcm.ulaval.ca)

## 2.1 Résumé

Les animaux axéniques sont plus que jamais utilisés dans la recherche expérimentale et la meilleure façon de confirmer leur statut reste incertaine, en particulier pour les cages individuelles scellées à pression positive. Ce rapport propose des moyens simples de détecter les contaminants résultant du développement, de la validation et de l'optimisation de trois méthodes différentes (culture, microscopie, biologie moléculaire), ainsi qu'en les testant *in situ* en contaminant volontairement des animaux axéniques. Les résultats suggèrent que les fèces et les écouvillons d'IBS peuvent être utilisés pour la culture, tandis que pour la microscopie et la biologie moléculaire, les fèces uniquement suffisent. Les résultats *in situ* suggèrent que les méthodes de culture et de biologie moléculaire peuvent détecter jusqu'à 100% des événements de contamination tandis que la microscopie peut générer beaucoup de faux résultats. Ce rapport fournit également des conseils pour aider les utilisateurs dans leur choix de méthode de détection.

## **2.2 Abstract**

The use of axenic animal models in experimental research has exponentially grown in the past few years. However, the most reliable way for confirming their axenic status still remains unclear, especially when using individual ventilated positive-pressure cages such as the Isocage, which are at a greater risk of contamination when opened compared to isolators. This study proposes simple ways to detect microbial contaminants resulting by developing, validating and optimizing three different methods (culture, microscopy, molecular biology). These three approaches were also tested in situ by spiking axenic animals with different microorganisms. Our results suggest that the culture method can be used for faeces and surface station (IBS) swabs exclusively (in Brain Heart Infusion for 7 days at 25°C and 37°C in aerobic conditions, and at 30°C in anaerobic conditions), while microscopy (wet mounts) and molecular biology (quantitative PCR) were only suitable for faecal matter analyses. In situ results suggests that the culture and molecular biology methods can detect up to 100% of contamination events while the microscopy approach generates many erroneous results when not performed by a skilled microscopist. This report validates simple but complimentary tests that can be used for optimal detection of contaminants in axenic animal facilities.

## **2.3 Keywords**

Germ-Free; Axenic; Mice; Contaminants; Culture; Microscopy; Molecular Biology; qPCR

## 2.4 : Introduction

Axenic animals are being used more than ever before to study a large variety of subjects since the discovery of the microbiota role on its host. Consequently, one of the most common application for these animals is the use of axenic mice to colonize mice with a known microbiota to study the relationships between the host microbiota and disease. For example, colonization of axenic mice with specific gut microbiota has proved the impact of microbiota on hepatic health (Hartmann et al., 2019); the influence of systemic immune response in some neurological disorders and the impact on pain and cognition in multiple sclerosis, Guillain-Barré Syndrome and Alzheimer's disease (Catanzaro et al., 2015); and the microbiota implication in chronic intestinal inflammation and in the development of colon neoplasia (Tlaskalova-Hogenova et al., 2011). Axenic mice are also used to study the effect of microbiota on the host physiology which can, for example, regulate skeletal muscle mass and function in mice (Lahiri et al., 2019), or induce obesity (Ridaura et al., 2013).

To maintain the axenic status, animals must be confined to an isolator in order to control their environment and to avoid contamination. Traditional isolators and individually ventilated cages (ICV), which includes the recent positive pressure sealing system, as used by the Tecniplast cage level isolator ISOcage® (Tecniplast®, Montreal, Canada, herein referred to as Isocage), are most commonly used. Therefore, isolators have considerable disadvantages like the fact that all the animals contained in the isolators share the same air, meaning all axenic animals in a given isolator are at risk of losing their axenic status in the event of a contamination (Basic and Bleich, 2019; Hecht et al., 2014; Lange et al., 2019; Niimi et al., 2019; Niimi and Takahashi, 2019; Paik et al., 2015). At the opposite, all Isocages are their own isolator at cage level and can allow multiple simultaneous protocols at a time in the same rack. However, despite these cages being their own individual hygienic units (Brielmeier et al., 2006), each cage is still at risk of being contaminated by the outside environment every time it is opened.

Microbiological quality controls for axenic animals housed in traditional isolator or cage level isolator use the same methodology, except that in cage level isolator, each of them must have its own microbiological status confirmed. In general, a mix between culture,

molecular biology and microscopy approaches is applied to define the axenic status of animals (Schoeb et al., 2017). For culture methods, faeces, bedding and food are the most frequently used samples, incubated in two or more culture media, in aerobic and anaerobic conditions, at a single or multiples temperatures (Arvidsson et al., 2012; Basic and Bleich, 2019; Fontaine et al., 2015; Hecht et al., 2014; Karaman, 2015; Lange et al., 2019; Nicklas et al., 2015; Niimi et al., 2019; Paik et al., 2015). The liquid and solid culture media used vary a lot, although the two more often chosen are the brain heart infusion medium for the isolation of bacteria (Arvidsson et al., 2012; Nicklas et al., 2015; Niimi et al., 2019) and the thioglycolate medium for the isolation of fungi. Incubation time varies between 24h to 14 days, but 7 days is the most frequently chosen delay (Arvidsson et al., 2012; Fontaine et al., 2015; Hecht et al., 2014; Lange et al., 2019; Nicklas et al., 2015; Niimi et al., 2019; Paik et al., 2015). However, although culture approach is simple and inexpensive, it has limitations in terms of nutrient requirements or in the growth rate of certain microorganisms, which can lead to erroneous results (Fontaine et al., 2015). Culture medium are easy to contaminate and false positives can generate significant financial and animal losses (Fontaine et al., 2015), and the chances of contamination increase if the sample has to undergo a lot of processing before incubation. According to the literature concerning Isocage quality control, samples are collected and tested either for each cage individually ( Hecht et al., 2014) or are pooled for group analysis (Niimi et al., 2019). However, this latter way of proceeding, although it requires less investment than individual sampling, does not make it possible to target the faulty cage in the event of positive results.

For microscopy approach, wet mounts are sometime selected, but Gram strains remain the most used method for the determination of axenic status (Schoeb et al., 2017). Observations of faeces and/or cecal contents of animals are performed at 1000x magnification with immersion oil by diluting the sample in sterile water or saline (Schoeb et al., 2017) or by direct observation of a swabbed faeces (Fontaine et al., 2015). However, it has been demonstrated in the literature that bacteria present in food before autoclaving or after irradiation can be detected by microscopy, since they retain their bacterial morphology even after passing through the digestive tract and keep the possibility of absorbing dye, although they are not detectable by molecular biology due to the degradation of their DNA

(Fontaine et al., 2015; Midtvedt and Gustafsson, 2005; Nicklas et al., 2015; Niimi et al., 2019; Taylor et al., 1986). Consequently, this complicates the analysis when the objective is to demonstrate that an animal is free from microorganisms. It is often advisable to interpret microscopy results in parallel with culture and molecular biology results (Schoeb et al., 2017) but also use the expertise of an experienced microscopist since mastering microscopy techniques requires some practice (Packey et al., 2013; Schoeb et al., 2017). It has been documented that some of the authors also proposed the detection of parasites using microscopy approaches (Karaman, 2015; Nicklas et al., 2015)

Finally, the use of molecular biology methods has the advantage of allowing the detection of microorganisms that are not culturable or difficult to isolate by culture that could colonize axenic animals (Schoeb et al., 2017). Non-quantitative and quantitative polymerase chain reactions (PCR and qPCR) using primers targeting the conserved region of the 16S rRNA gene are most used for detecting bacterial contaminants in axenic animals (Arvidsson et al., 2012; Basic and Bleich, 2019; Fontaine et al., 2015; Lange et al., 2019; Nicklas et al., 2015; Packey et al., 2013; Paik et al., 2015). The use of this type of universal primer is optimal for the detection of bacteria since the identity of the contaminants is unknown. Mice faeces are the most often used sample, treated with extraction kits specially designed for faeces (Fontaine et al., 2015; Lange et al., 2019; Nicklas et al., 2015; Paik et al., 2015). In addition, extreme care must be taken when processing axenic samples used for molecular biology since all microorganisms entering in the samples can potentially cause amplification, and therefore false positives. Consequently, this type of method carries a significant risk of contamination (Nicklas et al., 2015). However, it should be kept in mind that molecular biology techniques, unlike those of culture and microscopy, do not allow the detection of several types of microorganisms and are rather specific, which means that several reactions with other types primers must be performed in order to obtain information on the likely contaminants of an animal. It has thus been documented that the presence of other microorganisms than bacteria is sometimes sought by molecular biology, i.e. for archaea and molds (Packey et al., 2013) and certain specific viruses (Nicklas et al., 2015).

There is a wide range of methods that are currently used to detect a microbial contamination in axenic conditions, from those that target only a single microbe to those that target multiple microbial types. Methods used for the sampling and the sample choice of cage level isolators such as Isocage also tend to be extremely varied, as there is no consensus about the best way to detect a contamination. The majority of the detection methods are vulnerable to post-sampling contaminations, since they require samples to be handled after they leave the biosafety station. Furthermore, the large number of cage samples that are collected for the cultures increase the amount of handling required, in addition to being time-consuming, while microscopy methods require a minimum of microscopy skills.

The aim of this study was to determine the more effective methods for detecting a bacterial contamination using the Isocages. This was achieved by validating and optimizing three different methods (culture, microscopy and molecular biology), and by challenging the final methods *in situ* by spiking axenic animals with different microorganisms.

## **2.5 : Materials and methods**

### **2.5.1 : Axenic animal facility**

The axenic animal facility used in this report consisted of two rooms that are exclusively used for axenic or gnotobiotic purposes. Each room contained a full rack of 30 Isocages and an Isocage Biosafety Station (IBS, Tecniplast®). The IBS was equipped with a disinfectant dunk tank in which all incoming and outgoing material such as cages passed through to avoid laminar airflow perturbations. Only the incoming material was disinfected. The disinfectant used for the immersion disinfection was a 200 ppm MB-10 solution (Quip Laboratories, Wilmington, NC, USA), while a spray solution was used between cage manipulations on the work surface and gloves inside de IBS. Between each use, the IBS was fumigated with 30% oxygen peroxide (J. T. Baker®, Avantor®, Radnor Township, PA, USA). The entire room was also fumigated with the same gas every three months. There was an antechamber attached to each of the two rooms, allowing for material and staff preparation. Personnel that handled the animals were required to follow a personal protection protocol: before entering the room, wash hands and then put on medical gloves, a hair cover, a coverall suit, a full-face



chemical cartridge mask (Powered air-purifying respirator, 3M Health Care, Saint Paul, MN, USA), clean cover shoes and a second pair of gloves. For daily animal observations, a single-use medical gown and N95 mask (3M Health Care) were used instead of the coverall suit and full-face chemical cartridge mask.

## **2.5.2 : Cultures**

The culture methods used selected samples collected from the direct environment of the mice (all the elements present in the cage, faeces, bedding, water, food and cotton wool called Nestlet) as well as swabs from the Isocage Biosafety Station (IBS), in order to ensure a sterile work surface. The culture medium used was Bacto™ Brain Heart Infusion (BHI, BD, Sparks, MD, USA). The samples were introduced directly from the cage to the BHI tubes inside the IBS. Three different incubation conditions were applied to screen for as many types of microorganisms as possible (25 °C aerobic for environmental microorganism, 37 °C aerobic for human and mice colonizers, and 30°C anaerobic). Samples were incubated for up to seven days to allow for the detection of slow growing microorganisms. At the end of the incubation period, medium turbidity was measured using an optical density (OD) reader (Cell Density Meter Model 40, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Samples with an OD greater than zero were considered to be potentially positive for contaminants. In these cases, isolation measures were put in place, in which samples were directly examined using phase-contrast microscopy and subcultured on solid Bacto™ Brain Heart Infusion Agar (BHIA, BD) medium. The samples were considered positive if bacteria were visible under a microscope or in the subcultures.

### *2.5.2.1 : Validity, confirmation and optimization of culture method*

In order to determine the most sensitive samples type for contaminant detection in Isocages, non-axenic mice were introduced individually into sterile cages. This was done in order to assess the likelihood of the mice to contaminate elements of their environment during the time between two cage changes. Samples of the soiled cages were collected at every cage change for six weeks for a total of 108 Isocages changed in March and April 2017. The contamination profile of the non-axenic mice was then validated by comparing with the

positive samples resulting from four occasional and accidental contaminations of seven Isocages hosting axenic animals that occurred during the first year of the axenic platform (June 2017 to November 2018). Finally, optimization of the culture method was obtained by targeting the highest percentage of positive samples obtained with either methods from both axenic and non-axenic mice using a Tukey's multiple comparison test. The results were considered significant when *p-value* were less than 0.05.

### **2.5.3 : Microscopy**

The microscopy methods used in this research involved direct microscopic observations of samples. Cage samples (faeces, bedding, water, food and cotton wool called Nestlet) from three types of mice were selected: non-axenic mice (NA, 4 cages); accidentally contaminated axenic mice with negative culture (AC, 7 cages); and axenic mice (A, 15 cages). Sample were collected in triplicate and diluted in 1 mL of sterile water. Observations were conducted by examining 20 near-fields of a sample for a maximum of 10 seconds each using Laborlux S Microscope (Leitz, Stuttgart, Germany). Blind readings using wet mounts and Gram stains were performed.

### **2.5.4 : Molecular biology techniques**

Molecular biology detection methods were tested on faecal samples from axenic mice (15), non-axenic mice (4) and accidentally contaminated mice (7). Extraction was performed on five mice faeces using the QIAamp® PowerFecal® DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany) in sterile conditions. A real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed on the samples according to the protocol described by Bach et al. (Bach et al., 2001), using the universal total bacteria primers EUB R (5'-GACARCCATGCASCACCTG-3') and EUB F (5'-GGTAGTCYAYGCMSTAAACG-3'). Negative controls were run for the extraction and qPCR.

#### 2.5.4.1 : Data analysis

The «Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline» by the Clinical and Laboratory Standards Institute (Armbruster and Pry, 2008) were used to determine the limit of blank (LOB, Equation 1) and the limit of detection (LOD, Equation 2) for the molecular biology method used in this study.

Equation 1 : Determination of the limit of blank for the molecular biology method

$$\text{LOB} = \mu_B + 1.645\sigma_B$$

Equation 2 : Determination of the limit of detection for the molecular biology method

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645(\text{SD}_{\text{Low concentration sample}})$$

The LOB was used to assess the background noise generated by the presence of contaminant DNA introduced during sample handling. The LOB was based on the mean of negative controls ( $\mu_B$ ) (extraction control and qPCR no template control) and the standard deviation of the negative controls ( $\sigma_B$ ). By using the LOD, it is possible to determine the threshold at which a sample can be considered positive. The LOD is based on the LOB and the standard deviation between samples of known low concentrations ( $\text{SD}_{\text{Low concentration sample}}$ ). In our study, we used the standard deviation of samples containing 10 copies of genomes. The LOB and the LOD were determined for every extraction and qPCR analysis.

#### **2.5.5 : Testing *in situ* the methods effectiveness to detect spiked microbial contamination over time**

Twenty-one six-weeks-old male C57BL/6 axenic mice from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA) were used and housed in as many Isocages for this experiment. All the mice were handled according to the CPAUL and the CCPA guidelines and as described in the ethics authorization request # 2016-109-4A. Sets of three axenic mice were artificially contaminated with only one of the following microbial strains: *Staphylococcus epidermidis* (SE, 37°C aerobic, isolated from a previously contaminated axenic Isocage, GenBank

sequence ID: MT585538); *Lactobacillus reuteri* (LR, 37°C anaerobic, isolated from a non-axenic mouse faeces, GenBank sequence ID: CP054657.1); *Bacillus atrophaeus* (BA, 25°C aerobic, from the author's bacterial collection, GenBank sequence ID: MN826517.1); *Clostridium sporogenes* (CS, anaerobic, from Luc Trudel at Université Laval, GenBank sequence ID: MT356160.1); or *Saccharomyces cerevisiae* (SC, isolated from Fleischmann's instant yeast, GenBank sequence ID: NR\_111007.1). Three axenic mice were maintained as negative controls. As presented in Figure 9A, a pellet was contaminated with approximately 100 cells of a single microorganism and put in the cage for 24h to serve as a contamination source mimicking a natural contamination event. After this period, cages were changed and samples were collected. Additional samples were collected after 4, 7, 11 and 14 days to determine the incubation period required to detect the microorganisms that were introduced.

#### 2.5.5.1 : Cultures

Even if the optimized version of the culture method involved three tubes incubated (BHI broth at either 25°C and 37°C in aerobic conditions, and at 30°C in anaerobic conditions) a total of 19 fecal samples were collected per cage and were incubated for statistical purpose. All chosen stains having an optimal growth condition ( $C_x$ ) amongst the three selected, 17 of these samples were incubated under its optimal condition to have an overview of the chances of selecting a positive sample in the cage. The two remaining samples were incubated under the two other conditions ( $C_A$  and  $C_B$ ). The likelihood of detecting spiked microbial contamination when testing the culture method effectiveness *in situ*, expressed in percentage of positive samples (%Pos), was calculated using Equation 3.

Equation 3 : Determination of the percentage of positive samples for the culture method used for the *in situ* protocol

$$\%Pos = \frac{(C_A + C_B + C_x/17)}{3}$$

#### 2.5.5.2 : Microscopy

For microscopy analyses, wet mounts of a fresh faeces from each cage, diluted in 1mL of sterile water, were used and examined by four microbiologists: three with basic knowledge

in microscopy (basic microscopists), and a skilled microscopist. Microscopists had to indicate the morphology of the seen microbial contaminants as well as their quantity for 20 near-fields at 1000x magnification.

#### *2.5.5.3 : Molecular biology techniques*

Identification of the microorganisms used for artificial contamination was confirmed using 16S sequencing from samples collected on day 0 (contamination solution) and day 14 post-contamination (isolated from faeces) as follow. DNA extraction was performed using a Whatman™FTA™ Classic Card (GE Healthcare Life Science, now called Cytiva, Marlborough, MA, USA), as recommended by the supplier. A PCR was performed for each using 5 µL of *5X Green GoTaq Flexi buffer*, 1 µL of *dNTP mix*, 3 µL of *MgCl<sub>2</sub>*, 0.2 µL of *GoTaq Flexi Polymerase* (Promega, Madison, WI, USA). To identify bacteria, 50 mM of universal 16S RNA primers 63F (5'-CGGCCTAACACATGCAAGTC-3') and 1387R (5'-GGCGGWGTGTACAAGGC-3') were used (Marchesi et al., 1998). ITS region primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') were used for yeast identification in the same concentrations as for the bacterial primers. Three punches from FTA™ cards were incorporated into the final 50 µL PCR reaction for all strains. Amplification were performed using a thermocycler (DYAD Peltier thermal cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and consisted of a total of 40 cycles including at 94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, 72°C for 90 sec. A final cycle was performed at 72°C for 5 minutes for the bacteria, while the protocol described by White et al. was performed for the yeast (White et al., 1990).

## **2.6 : Results**

### **2.6.1 : Cultures**

The results from the introduction of contaminated mice into sterile cages are presented in Figure 8A. In 100% of the 108 Isocages, the faeces showed microbial growth, followed by Nestlets (95%), cage swabs (86%) and bedding (83%). The percentages of positive samples for mouse swabs, IBS swabs, food and water were 76%, 51%, 37% and 12% respectively.

For the occasional and accidental contamination of axenic mice (Fig. 8B) a similar pattern of contamination was observed. One-hundred percent of the faeces, Nestlets, bedding and mouse swabs were positive, while smaller percentage of cage swabs (93%), IBS swabs (6%), food (67%) and water (0%) were positive. However, the samples occasionally generated ODs greater than zero even though there was no deposit or macroscopic sign of growth before agitation of the tubes. There were no colonies detected on solid media and there were no visible microorganisms identified through microscopy. These samples were therefore considered to be negatives. The lowest positive OD that was observed was 0.35. Statistical analyses showed no significant differences between faeces and Nestlets for the non-axenic mice (Fig. 8A), while significant differences were found for the other samples.

### **2.6.2 : Microscopy**

Microscopy results are presented in Table 7. For bedding and water, all the samples were considered negative for the three mouse types and the two microscopic methods. For food and nestlet, inconclusive and negative results were mostly obtained from all mouse types. An inconclusive result means that the microscopist was not able to unequivocally confirm the status of the sample due to the presence of indistinct elements on strains during readings. The water samples contained no detectable bacteria in all of the samples from both microscopic treatments. Faeces samples from non-axenic mice (NA,) were positives and axenic mice (A) were negative using both treatments. Finally, for the axenic accidentally contaminated mice (AC), faeces were considered positive using wet mount while inconclusive with Gram stain.

### **2.6.3 : Molecular biology techniques**

No trace of DNA was detected on axenic mouse faeces. On the other hand, an average of  $8.63 \times 10^{10}$  *E. coli*-equivalent genomes per gram of faeces (EqGen/g) in non-axenic mice. Finally,  $7 \times 10^9$  EqGen/g was detected in accidentally contaminated axenic mice.

## **2.6.4 : Testing *in situ* the methods effectiveness to detect spiked microbial contamination over time**

### *2.6.4.1 : Cultures*

After 14 days in the cages, the negative control axenic (A) mice remained axenic according culture method. All IBS swabs showed no growth during all the protocol. For culture of faeces from mice contaminated with *Clostridium sporogenes* (CS) and *Staphylococcus epidermidis* (SE), bacterial presence was detectable 24h post-contamination (p24h) in 3/19 faeces and 10/19 faeces, respectively, on average. After 14 days (p14d), all the faeces collected were positive for CS and SE. Only one out of the three cages contaminated with *Bacillus atrophaeus* (BA) showed growth in faeces between 24h (4/19 samples) and 14 days (19/19 samples). For the two other BA-contaminated cages as well as the cages contaminated with *Lactobacillus reuteri* (LR) and *Saccharomyces cerevisiae* (SC)-contaminated cages, none were positive from the day of contamination to 14 days post-contamination. The protocol for this experiment has been slightly modified and repeated for the microorganisms that did not successfully colonize the mice within 24h. Instead of conducting a cage change after 24h post-contamination, mice were kept in the same cage for 2 weeks, with faeces collection after 24h, 4 days, 7 days and 14 days. The results demonstrated growth for all of the species after 4 days (p4d; 18/19 faeces for LR and BA, 19/19 faeces for SC) and 14 days (p14d; 17/19 for LR and 17/17 for BA and SC). After 14 days all of the known bacterial species identities were confirmed in the samples. According to the Equation 3 and as presented in Figure 9B, the likelihood for the detection of a microbial contamination after 14 days varied between 66% and 100%, according to the used microbial models (66% for LR, 100% for SE, BA, CS and SC). Note that only the cages that showed positive growth have been used to produce the Figure 9B, except for the negative controls.

### *2.6.4.2 : Microscopy*

Using microscopy, fresh faeces from each cage were observed on wet mounts by three microbiologists with basic knowledge in microscopy (basic microscopists), as well as a skilled microscopist. For the data analysis, false positive means that the faeces sample was considered negative when the mice were not contaminated or when microscopist noted

another type of microorganism morphology (e.g., noted positive with cocci while animals were contaminated with *Bacillus*). False negative was when a mouse was contaminated, but the presence of microorganisms was not noted by a microscopist. Unconclusive results mean that the microscopist was not able to unequivocally categorize the mice status according to the microscopy method only. The animal status was determined according to the other two methods and to the skilled microscopists lectures. On many occasions (18/56), basic microscopists falsely identified contaminants in faeces samples of the axenic mice while skilled microscopist generated no false positives (0/28), and 4 inconclusive results (4/28). At p24h, 9/22 axenic faeces were falsely considered positive while 4/6 were accurately identified as positive for CA and BA by the basic microscopists. None of the SE cages were noted positive by the basic microscopists. For the skilled microscopist, 2/3 CS and 1/3 SE has been positive while 1/3 CS and 2/3 SE were inconclusive. Microorganisms were detectable by all four microscopists between p4d and p14d. However, LR was detected for 9/24 (pooled results) faeces by basic users compared to 11/12 faeces for the skilled user. For all 161 microscopic observations made during the experiments (Fig. 9C), the basic microscopists correctly identified an average of 38 to 51% of the samples, while 22% to 44% of the samples were erroneous results (false positives or false negatives). For the skilled microscopist, 80% of the results were correctly identified, with no erroneous results. However, in 20% of cases, the skilled microscopist was unable to determine the result. All the *Saccharomyces cerevisiae* (SC) samples were accurately identified by the skilled microscopist, while only one of the three basic users detected this species once throughout the entire protocol.

#### 2.6.4.3 : Molecular biology techniques

Using molecular biology method, none of the faeces from the axenic (A) mice or the mice contaminated with yeast (SC) contained bacterial DNA after amplification (Fig.9D). After 24h, *S. epidemidis* (SE) was the only species of detectable bacterial, with a concentration of  $9.1E+04$  *E. coli*-equivalent genomes per gram of faeces (EqGen/g). For all the other species, concentrations between  $1.06E+07$  and  $7.83E+07$  EqGen/g were detected from four days post-contamination (p4d) to 14 days post-contamination (p14d). One-hundred percent of the



model bacteria were detectable from p4d, while 0% of the yeasts were detected using this method. However, the yeasts were detected using the ITS primers mentioned previously.

## **2.7 : Discussion**

### **2.7.1 : Cultures**

For both the non-axenic mice that were introduced into sterile cages (Fig. 8A), and the axenic mice that were accidentally contaminated (Fig. 8B), faeces tested positive for contamination 100% of the time. In contrast, water samples had the lowest proportion of positive samples, perhaps due to the low levels of nutrients available in the drinking water and the tightness of seal between the straw and the cap, reducing chances for bacterial intrusion. For the IBS swabs, the sampling campaign in which accidentally contaminated axenic mice were involved having took place months after the one using non-axenic mice, the lowest proportion of positive samples could demonstrate an improvement of the staff in axenic mice handling.

It is time consuming to collect samples from all the materials (faeces, food, Nestlet, water, bedding, swab) in all the cages in triplicate and incubate the samples under three different conditions. Therefore, in order to reduce the time burden, only the sample type that most frequently tested positive was selected for the regular quality control procedures. Fecal samples were the only sample that had 100% of detection effectiveness for both non-axenic (Fig. 8A) and accidentally contaminated axenic (Fig. 8B) cages when cultured. The IBS swabs, despite their low percentage of detection (54% for non-axenic, 6% for axenic accidentally contaminated), were conserved as control for technical handling. Since some samples tended to generate ODs that were greater than zero even without contamination and the presence of microbial growth in tubes were visually evident, ODs were not preserve for regular quality control procedures. The three incubation conditions having their proper microorganism targets (i.e., 25 °C aerobic for environmental microorganism, 37 °C aerobic for human and mice colonizers, and anaerobic at 30 °C) none of them was eliminated. The choice of brain heart infusion (BHI) as unique culture media was encouraged for simplicity and efficiency concerns. BHI being a non-selective medium allowing fastidious and non-

fastidious bacteria, yeast, and fungi, it represents a good polyvalent compromise between several of the media used by other axenic users. However, knowing that a great part of axenic environment are colonizers of the human, other mice hosted in axenic facility and environmental microorganisms (Basic and Bleich, 2019), the choice of media and incubation conditions are adapted to most probable contaminant of axenic cages. Consequently, knowing that some microorganisms might not growth in this media, the use of other methods of detection is recommended to detect them.

### **2.7.2 : Microscopy method**

The material fibers in the bedding and food samples caused a great deal of refraction on wet mounts and absorbed a large amount of Gram dye. This made it extremely difficult to distinguish microorganisms and occasionally led to inconclusive readings. The same was true for the Nestlet, which also produced the cotton fibers that made detection more challenging and sometimes led to distorted images of the specimens under the microscope. Water samples contained such a diluted number of microorganisms that they sometimes could not be detected in the non-axenic (NA) mouse cages. Discerning the microbiological status from fecal samples was easier when using wet mounts, which allowed for the visualization of microbial motility, as reported elsewhere (Nicklas et al., 2015). Observations using Gram staining was at times arduous to perform these types of observations and is therefore recommended, as previously mentioned (Arvidsson et al., 2012; Fontaine et al., 2015; Karaman, 2015; Packey et al., 2013).

### **2.7.3 : Molecular biology techniques**

No microbial DNA was observed in axenic mouse faeces, as previously noted (Fontaine et al., 2015; Packey et al., 2013; Paik et al., 2015). For the accidentally contaminated axenic mice,  $7E+09$  EqGen/g was detected. This value is higher than what was observed elsewhere with contaminated mice:  $10E+05$  to  $10E+06$  copies of the 16S rRNA gene per gram of faeces (Packey et al., 2013). There was an average of  $8.63E+10$  EqGen/g detected in non-axenic mice, suggesting that a high concentration of DNA could be present when a contamination occurs. However, there is not any proof of a naturally low concentrations contaminants in

axenic contexts. This suggests that either modest contamination concentrations are not possible in axenic animals, or this kind of contamination has never truly been detected due to the limitations in the methods that are currently used. This is supported by Fontaine and collaborators who showed that low spiked concentrations of contaminants (under to 10E+03 to 10E+4 colony forming-unit per gram of faeces) could not be detected by PCR (Fontaine et al., 2015). However, the literature also suggests that in a niche where there are no biological habitants (here, the mice and the cage), the first compatible colonizer to arrive (here, microorganisms) will often show great dispersal capacity in the unoccupied space, especially if the environment responds to the microorganism's nutritional needs (Atlas et al., 1998; McArthur, 2006).

#### **2.7.4 : Testing *in situ* the methods effectiveness to detect spiked microbial contamination over time**

##### *2.7.4.1: Cultures*

Optimized culture method results (Fig. 9B) demonstrated that as quickly as 24 hours post-contamination (p24h), certain contaminants could be detected in axenic cages (SE, CS, BA), while others required more time to become detectable (LR, SE, BA). This result suggests that for some of the microorganism, more than 24h may be required to colonize the animal. For almost all the species, there was a high level of positive detection between p4d and p14d. Considering that all fecal samples were retained in the cages from day 0 to day 14, it is possible that the faeces from when the animals were axenic (before contamination) or fecal samples containing dead bacteria were used for the culture and resulted in negative reads. The results also show that in 66% to 100% of cases, contamination was detectable using only three faecal samples that were incubated for a maximum of 7 days in BHI (at 25°C and 37°C in aerobic conditions and at 30°C in anaerobic conditions). However, since there remains a possibility of contamination with unculturable microorganisms in the selected incubation conditions, we recommend the use of other methods, such as microscopy and molecular biology, to complement the culture method and to confirm axenic status.

#### 2.7.4.2 : *Microscopy*

For microscopy using wet mounts and fresh faeces, the accuracy of the results was determined by the microbial concentration, the microorganism morphology and the microscopist's level of experience (22% to 44% error for microscopists with basic knowledge versus 0% for the skilled microscopist). All the axenic samples and those from p24h were the most inaccurately observed by the basic-level microscope users, since they contained none or very few microorganisms.

#### 2.7.4.3 : *Molecular biology techniques*

For the molecular biology method, only *Staphylococcus epidermidis* (SE) was detected at p24h, contrary to what was observed using cultures and microscopy (CS and BA). However, CS and BA demonstrated low bacterial concentrations, which can affect detection. The high DNA concentrations that were detected between p4d and p14d suggest once again that high concentrations of DNA may be present when a contamination occurs in axenic animals (1.06E+07 to 7.83E+07 EqGen/g).

The dispersal capacity in unoccupied environment theory mentioned above is supported by the fact that using cultures, microscopy and molecular biology, the contaminants were detected at very high concentrations after only four days. This suggests that when an axenic mouse is contaminated by a microbial agent, the microorganism will colonize the mouse to such an extent that detection is obvious. The limitations for detecting low concentrations of microbes would therefore be problematic for protocols that are shorter than 4 days and not for those that are longer than 4 days.

#### 2.7.4.4 : *Selection of the detection method(s)*

Many aspects must be considered in order to choose the most efficient method to detect a contamination. First, according to our results from non-axenic mice and accidental contaminations, the effectiveness of each of the methods used alone was 66%-100% when using culture methods, 80% using microscopy (with a skilled microscopist), and 100% using molecular biology techniques. The time required for each technique differed depending on

the quantity of axenic samples. The culture method required up to 7 days of incubation while microscopic results were delivered within 24h. Molecular biology results were available within two days. The cost of each method is also an important factor to consider. Microscopy method is considered to be the least expensive method when only a microscope, slides and coverslips are necessary. However, the costs associated with the time required can vary depending on the microscopist's experience. The culture method is also inexpensive when only considering the price of materials (culture media, tubes), but can be more expensive in circumstances where all the required equipment (incubators, autoclaves, etc.) is not available. The purchase or rental of the necessary equipment can be quite expensive, but in order to ensure profitability, these costs must be factored into the *per diem* price of the mice. The materials required for molecular biology methods are the most expensive (extraction kit, Mastermix reagents, etc.), not to mention the equipment required to run these analyses, which have major implications for the overall price. Another factor that should be considered when choosing a detection method is the frequency of analysis. The frequency at which quality control is conducted for a certain microorganism should be representative of its likelihood of entering into the cages. The literature suggests that most of the contaminants detected in axenic animal facilities are human skin colonizer and environmental microorganisms (Basic and Bleich, 2019). According to researchers, the risk of viruses and parasites entering into the cages is very low (Basic and Bleich, 2019; Nicklas et al., 2015), and consequently, they require quality control detection less often than bacteria and environmental microorganisms and Archaea, which might also colonize axenic animals (Ramezani et al., 2018; Samuel and Gordon, 2006). Nicklas et al. have published interesting data about the frequency of analysis in axenic animal facility isolators (Nicklas et al., 2015). They proposed methods and testing frequencies depending on the sample type, which in this case were swabs of the isolator. PCR and culture methods were used to analyze these samples before animals were introduced into the isolator and control testing of the bedding and old food was conducted every 4 weeks. Multiple types of analyses from animal necropsy samples were performed every 3 to 6 months (microscopy, culture, virology, parasitology, PCR), and culture and PCR of fecal samples were performed every 4 weeks or before and during the transfer of animals. Finally, indicator tests for autoclave sterility were conducted for every batch of water, bedding and food (Nicklas et al., 2015). The use of cage level isolator (Isocage) in our study, which is

more at risk of microbial contamination than the traditional isolator, suggests that the frequency of testing applied by Nicklas et al. could be altered, given that each Isocage can harbor unique contaminants that other cages in the same rack might not contain.

When using Isocage or similar models, we recommend: decontaminating the station surface (IBS) with biological controls for every protocol; controlling one cage at each sterilization batch (including the bedding, food and water) using culture and biological controls; and controlling the interior of the cage every time it is opened using at least two different methods (to screen for as many microorganisms as possible). We suggest the use of a confirmation method to help determine the presence or absence of a microorganisms, as has been advised by other authors (Nicklas et al., 2015; Packey et al., 2013). If it is necessary to open the cage often (e.g. every day during a protocol), we would recommend screening for contaminants at the beginning of the protocol and then again every 4 days (since after 4 days, all the samples will be greatly positive according to most of the tested here). However, because a detection method for fungi, parasites, archaea and viruses has not yet been developed for Isocage, we cannot provide recommendation for their screening frequency.

## **2.8 : Conclusion**

In conclusion, this study has proposed simple ways to detect contaminants in axenic facilities using Isocages. These approaches were developed through the validation and optimization of three different methods (culture, microscopy, molecular biology) as well as by challenging these three methods *in situ* by spiking axenic animals with various microorganisms. Our detection method recommendations were provided based on: the effectiveness of the tested methods to detect spiked and natural contaminants, the different microbial types screened by each method, the time and cost associated with each method, and finally the frequency of analyses.

## 2.9 : Acknowledgements

Thanks to Amélia Bélanger Cayouette, Marie-Ève Dubuis and Magali-Wen St-Germain for the microscopic observations. Also, thanks to Laurence Daoust, Béatrice Choi, Geneviève Pilon and Philippe St-Pierre for reviewing this manuscript.

## 2.10 : References

- Armbruster, D.A., and T. Pry. 2008. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev.* 29 Suppl 1:S49-S52.
- Arvidsson, C., A. Hallén, and F. Bäckhed. 2012. Generating and analyzing germ-free mice. Vol. 2.
- Atlas, R.M., R. Bartha, and D. Atlas. 1998. Microbial ecology: Fundamentals and applications. Benjamin/Cummings.
- Bach, H.J., A. Hartmann, M. Schloter, and J.C. Munch. 2001. PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. *J. Microbiol. Methods.* 44:173-182.
- Basic, M., and A. Bleich. 2019. Gnotobiotics: Past, present and future. *Lab. Anim.* 53:232-243.
- Brielmeier, M., E. Mahabir, J.R. Needham, C. Lengger, P. Wilhelm, and J. Schmidt. 2006. Microbiological monitoring of laboratory mice and biocontainment in individually ventilated cages: a field study. *Lab. Anim.* 40:247-260.
- Catanzaro, R., M.G. Anzalone, F. Calabrese, M. Milazzo, M.L. Capuana, A. Italia, S. Occhipinti, and F. Marotta. 2015. The gut microbiota and its correlations with the central nervous system disorders. *Panminerva Medica.* 57:127-143.
- Fontaine, C.A., A.M. Skorupski, C.J. Vowles, N.E. Anderson, S.A. Poe, and K.A. Eaton. 2015. How free of germs is germ-free? Detection of bacterial contamination in a germ free mouse unit. *Gut microbes.* 6:225-233.
- Hartmann, P., H.K. Chu, Y. Duan, and B. Schnabl. 2019. Gut microbiota in liver disease: too much is harmful, nothing at all is not helpful either. *Am. J. Physiol.-Gastroint. Liver Physiol.* 316:G563-G573.
- Hecht, G., C. Bar-Nathan, G. Milite, I. Alon, Y. Moshe, L. Greenfeld, N. Dotsenko, J. Suez, M. Levy, C.A. Thaiss, H. Dafni, E. Elinav, and A. Harmelin. 2014. A simple cage-autonomous method

- for the maintenance of the barrier status of germ-free mice during experimentation. *Lab. Anim.* 48:292-297.
- Karaman, M. 2015. Microbiological standardization in small laboratory animals and recommendations for the monitoring. *J. Clin. Anal. Med.* 6:673-677.
- Lahiri, S., H. Kim, I. Garcia-Perez, M.M. Reza, K.A. Martin, P. Kundu, L.M. Cox, J. Selkrig, J.M. Posma, H.B. Zhang, P. Padmanabhan, C. Moret, B. Gulyas, M.J. Blaser, J. Auwerx, E. Holmes, J. Nicholson, W. Wahli, and S. Pettersson. 2019. The gut microbiota influences skeletal muscle mass and function in mice. *Sci. Transl. Med.* 11:15.
- Lange, M.E., R.R.E. Uwiera, and G.D. Inglis. 2019. Housing gnotobiotic mice in conventional animal facilities. *Current protocols in mouse biology.* 9:e59.
- Marchesi, J.R., T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom, and W.G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology.* 64:795-799.
- McArthur, J.V. 2006. Microbial ecology: An evolutionary approach. Elsevier Science.
- Midtvedt, T., and B. Gustafsson. 2005. Digestion of dead bacteria by germ-free rats. *Current Microbiology.* 6:13-15.
- Nicklas, W., L. Keubler, and A. Bleich. 2015. Maintaining and monitoring the defined microbiota status of gnotobiotic rodents. *Ilar j.* 56:241-249.
- Niimi, K., P. Hardy, B. Bilecki, and E. Takahashi. 2019. Rearing and breeding of germ-free mice for over 1 year in a sealed positive pressure cage system. *Japanese Journal of Veterinary Research.* 67:119-125.
- Niimi, K., and E. Takahashi. 2019. New system to examine the activity and water and food intake of germ-free mice in a sealed positive-pressure cage. *Heliyon.* 5:e02176.
- Packey, C.D., M.T. Shanahan, S. Manick, M.A. Bower, M. Ellermann, S.L. Tonkonogy, I.M. Carroll, and R.B. Sartor. 2013. Molecular detection of bacterial contamination in gnotobiotic rodent units. *Gut microbes.* 4:361-370.
- Paik, J., O. Pershutkina, S. Meeker, J.J. Yi, S. Dowling, C. Hsu, A.M. Hajjar, L. Maggio-Price, and D.A. Beck. 2015. Potential for using a hermetically-sealed, positive-pressured isocage system for studies involving germ-free mice outside a flexible-film isolator. *Gut microbes.* 6:255-265.



- Ramezani, A., T.D. Nolin, I.R. Barrows, M.G. Serrano, G.A. Buck, R. Regunathan-Shenk, R.E. West, P.S. Latham, R. Amdur, and D.S. Raj. 2018. Gut colonization with methanogenic archaea lowers plasma trimethylamine n-oxide concentrations in apolipoprotein e<sup>-/-</sup> mice. *Scientific reports*. 8:11.
- Ridaura, V.K., J.J. Faith, F.E. Rey, J.Y. Cheng, A.E. Duncan, A.L. Kau, N.W. Griffin, V. Lombard, B. Henrissat, J.R. Bain, M.J. Muehlbauer, O. Ilkayeva, C.F. Semenkovich, K. Funai, D.K. Hayashi, B.J. Lyle, M.C. Martini, L.K. Ursell, J.C. Clemente, W. Van Treuren, W.A. Walters, R. Knight, C.B. Newgard, A.C. Heath, and J.I. Gordon. 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 341:1079-U1049.
- Samuel, B.S., and J.I. Gordon. 2006. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:10011-10016.
- Schoeb, T.R., R.J. Rahija, C. Boyd, R.P. Orcutt, and K.A. Eaton. 2017. Chapter 2 - principles of establishing and operating a gnotobiotic facility. *In* Gnotobiotics. T.R. Schoeb and K.A. Eaton, editors. Academic Press. 21-63.
- Taylor, D.M., L. Read, and D.L. Neal. 1986. Determining the viability of fecal bacteria present in germ-free mice. *Lab. Anim*. 20:22-26.
- Taskalova-Hogenova, H., R. Stepankova, H. Kozakova, T. Hudcovic, L. Vannucci, L. Tuckova, P. Rossmann, T. Hrnecir, M. Kverka, Z. Zakostelska, K. Klimesova, J. Pribylova, J. Bartova, D. Sanchez, P. Fundova, D. Borovska, D. Srutkova, Z. Zidek, M. Schwarzer, P. Drastich, and D.P. Funda. 2011. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell. Mol. Immunol*. 8:110-120.
- White, T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315-322.

## 2.11 : Tables

Table 7 : Blind readings of Isocage samples using wet mounts and Gram stain for different mouse types

Test	Mouse type	Faeces	Bedding	Nestlet	Food	Water
Wet Mount	NA	+	-	+/-	+/-	-
	AC	+	-	+/-	-	-
	A	-	-	+/-	-	-
Gram Stain	NA	+	-	+/-	+/-	-
	AC	+/-	-	-	+/-	-
	A	-	-	-	+/-	-

## 2.12 : Figures

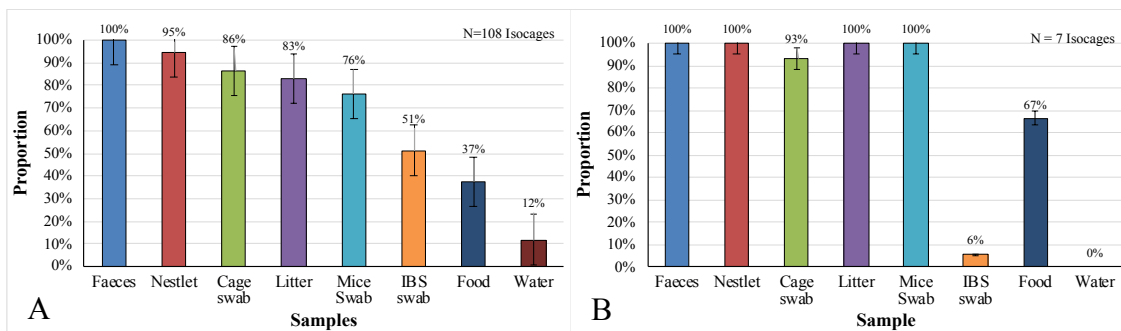


Figure 8 : Proportion of positive samples per culture when non-axenic and accidentally contaminated axenic mice are introduced into sterile cages after two weeks.

A) Non-axenic mice; B) Accidentally contaminated mice.

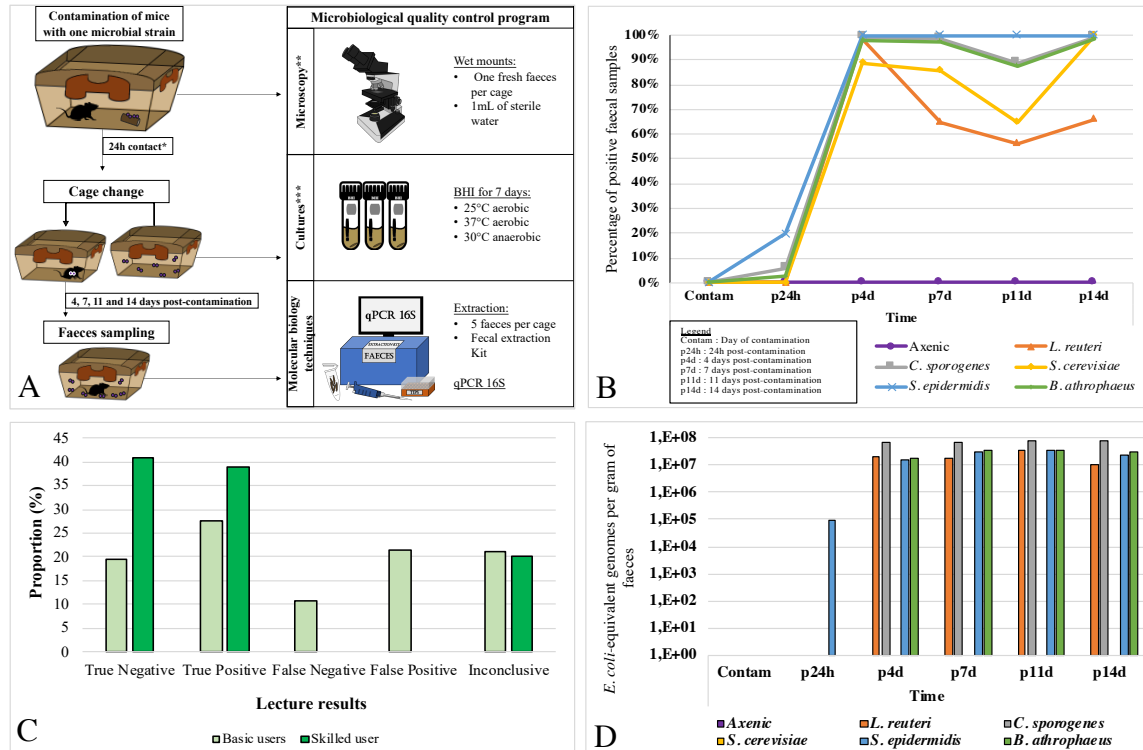


Figure 9 : *In situ* protocol and results for the three optimized methods.

A) *In situ* protocol. \*24h post-contamination cage change was not applicable for the second attempt only, applicable to 2 GF, 3 LR, 3 SC and 2 BA. \*\*3 basic and 1 skilled microscopists performed the blind wet mounts lectures to determine microscopy method effectiveness *in situ*. \*\*\*Exceptionally for the *in situ* protocol, 19 samples were taken for the culture method. 17 tubes were incubated in the microorganism's optimal condition, and the two other tubes were incubated in the two other conditions. B) Likelihood of detecting spiked microbial contamination when testing the culture method effectiveness *in situ*, expressed in percentage of positive samples. C) Proportions of the 5 types of results obtained from 4 microscopists during the examination of faeces sample from microbially spiked mice in order to test the effectiveness of the microscopic method *in situ*. D) DNA concentrations of each organism found in faeces of spiked mouse in order to test the effectiveness of the molecular biology method *in situ*.

## Chapitre 3 : Discussion générale

Les chapitres précédents ont permis de développer des méthodes de détection de microorganismes optimisées pour l'Isocage, de valider l'efficacité de méthodes de précautions visant à réduire la charge microbienne en local axénique et diminuer le temps de trempage dans le bain d'immersion. Ces méthodes optimisées ont été élaborées sur la base de critères objectifs et rationnels. Ainsi, même en sachant que la diminution des coûts associés aux méthodes et pratiques était l'un des buts à atteindre, les décisions d'optimisation ont été prises en définissant un niveau de qualité axénique que l'on jugeait acceptable, ainsi que des mesures pouvant facilement être comprises par les utilisateurs. En effet, il est important que les utilisateurs d'animaux axéniques aient conscience de ce qu'implique un programme de contrôle de la qualité associé aux animaux qu'ils utilisent afin de comprendre la complexité dudit programme, mais également les facteurs des risques et les possibles biais pouvant affecter les résultats de leurs protocoles. La connaissance des mesures de surveillance axéniques et leur développement doit donc être bien compris par les acteurs les mettant en place dans un établissement afin qu'ils puissent exposer les limites de leurs méthodes à leurs clients, bien les encadrer et les conseiller dans le processus décisionnel associé aux choix des méthodes de détection. Il en va de même pour définir les façons de travailler les plus sécuritaires possibles et adaptées à leurs besoins.

En animalerie axénique, il n'y a pas de protocole standardisé pour la détection des contaminants microbiologiques pour de nombreuses raisons. Pour n'en nommer que quelques-unes, les grandes variabilités entre les infrastructures d'hébergement peuvent faire varier les échantillons utilisés, leur quantité, ainsi que leur méthodes de prélèvement; les désinfectants utilisés, dont l'efficacité microbicide peut varier selon sa concentration, son temps de contact et sa nature chimique sur un microorganisme peuvent également être différentes d'un établissement à l'autre; et finalement les procédures de changement de cage, qui diffèrent selon l'usage d'un isolateur traditionnel ou d'un isolateur au niveau de la cage, ces dernières pouvant impliquer l'usage d'un bassin ou non pour l'entrée du matériel dans la hotte de changement de cage, sont tous des facteurs faisant en sorte qu'il n'y a pas de protocole standardisé de détection de contaminant en animalerie axénique. Par contre, pour une question de constance au niveau de la qualité des animaux utilisés d'un établissement à

l'autre, il devrait y avoir un certain suivi afin de s'assurer que dans aucun cas des variables microbiologiques non détectées ne puissent altérer les résultats d'une étude. Tout comme les animaux immunosupprimés et les SPF, qui sont supervisés par une réglementation et des critères et exigences particulières qui les définissent, les animaux axéniques devraient être soumis à une réglementation propre pour une question de constance et de cohérence entre les utilisateurs, les études axéniques, ainsi que les résultats obtenus. D'ici à l'élaboration d'un protocole standardisé et/ou de normes d'assurances qualité définies pour la surveillance du statut microbiologique de ces animaux, les études publiées les utilisant devraient au minimum indiquer les méthodes qu'elles ont utilisées, ainsi que les limites de celles-ci. Ainsi, le lecteur d'un article pourrait avoir une idée des possibles biais résultant d'un microorganisme dont la présence n'a pas été confirmée lors d'un protocole, donc en altérer potentiellement les résultats, plutôt que d'en assumer l'absence.

Par conséquent, pour le maintien d'une colonie reproductrice d'animaux axénique, il est certain que d'un établissement à l'autre, une standardisation serait bénéfique et permettrait de garantir que tous les protocoles existants utilisant des animaux axéniques ont fourni des animaux du même niveau de qualité du moins au début d'un protocole. C'est par contre le niveau de qualité pendant et jusqu'à la fin d'un protocole qui engendre des défis supplémentaires et qui pourrait diverger d'un établissement à l'autre, d'où l'importance de choisir les bonnes méthodes lors de l'élaboration du devis expérimental de suivi. La durée d'un protocole, la fréquence d'ouverture des cages, la lourdeur des manipulations et l'expérience technique des manipulateurs devraient être prise en compte par le responsable de l'assurance qualité microbiologique lorsqu'il élabore son plan de surveillance et qu'il choisit quel(s) type(s) de méthode(s) et quel(s) organisme(s) à détecter à quel moment. Ainsi, un protocole de 10 cages ne durant qu'une semaine durant laquelle toutes les cages sont ouvertes tous les jours n'aura pas nécessairement besoin de surveillance pour l'apparition de parasite et virus à toutes les ouvertures étant donné que leurs chances d'introduction dans une cage sont plutôt minces, et que leur détection sur une courte durée d'incubation est moins probable par rapport à un protocole de six mois à ouverture aux deux semaines. Par contre, la fréquence d'ouverture rapprochée des cages rend les animaux plus à risque d'être contaminés par les microorganismes naturellement présents dans l'environnement direct, soit

ceux dans la salle axénique. Le Chapitre 2 a permis de démontrer la présence dans la salle axénique de bactéries de la peau humaine, de l'environnement et des intestins des mammifères, mais également de moisissures environnementales. L'apparition de ces contaminants environnementaux devrait donc être surveillée avec grand soin. Toutefois, tel que d'écrit dans le Chapitre 2, la détection d'une contamination à l'intérieur d'une cage n'est généralement pas confirmée avant 4 jours post-contamination. Par conséquent, une fréquence quotidienne de vérification de la contamination dans les cages ne représente pas nécessairement un avantage important, en plus d'augmenter les coûts de réalisation du projet, d'accroître les risques de contamination accidentelle, et d'augmenter les chances d'obtenir des résultats incertains s'il y a présence d'une contamination âgée de moins de 4 jours. Ainsi, dans un cas d'ouverture fréquente sur une courte durée, il serait recommandé de tester les animaux au début, au milieu et à la fin du protocole plutôt qu'à toutes les ouvertures. Dans l'éventualité où une faible contamination pourrait survenir en fin de protocole, l'impact des contaminants sur les résultats et même leur concentration devrait être considérés par le chercheur. C'est entre autres la raison pour laquelle le chercheur devrait être conscient des risques de contamination possibles de son protocole avant même de l'entreprendre, car en contexte axénique, le risque zéro n'existe pas.

Par la suite, les limites des expériences effectuées dans cet ouvrage ne peuvent être ignorées. Tout d'abord, pour le Chapitre 1 sur la gestion des risques de contamination, la première limite est associée aux décomptes et à la diversité microbiens. Seulement les microorganismes cultivables selon les conditions sélectionnées ont pu être récupérés et considérés dans les résultats finaux. Par contre, dans le contexte actuel, l'implication des microorganismes morts a peu de valeur étant donné que c'est seulement les vivants qui étaient ciblées afin de déterminer leur risque de survie lorsqu'en contact avec le désinfectant du bassin d'immersion. C'est entre autres pour cela que la culture, permettant d'obtenir des microorganismes vivants et identifiables, a été sélectionnée plutôt que des méthodes de séquençage permettant d'obtenir l'identité de l'ensemble des microorganismes d'un environnement, sans toutefois déterminer leur viabilité lors de l'échantillonnage. Cependant, même si trois conditions d'incubation ont été choisies afin de couvrir le plus de microorganismes possibles, il est probable que les comptes aient été sous-estimés en raison

de microorganismes n'ayant pas rencontré les éléments nutritifs essentiels à leur croissance sur les milieux utilisés. Il est également possible que certains microorganismes anaérobies strictes aient trouvé le voyage jusqu'à la chambre anaérobie trop éprouvant dans les délais impartis et aient rendu l'âme avant leur arrivée, sous-estimant une fois encore les comptes obtenus et leur identité. Plus spécifiquement pour l'identification des espèces répertoriées en chambre non-axénique, étant donné que seulement une portion des microorganismes comptés a été identifiée, il est possible que les proportions d'identité aient été tourné à l'avantage des espèces les plus nombreuses au détriment de celles moins fréquentes qui, par conséquent, n'ont pas été ajoutées à la mosaïque de biodiversité obtenue. Reste, par contre, qu'il est intéressant d'avoir une idée des genres les plus fréquemment retrouvés afin de voir l'importance des mesures de précautions utilisées. Si, en général, les genres les plus retrouvés avaient été des organismes producteurs de spores, l'attention portée aux désinfectants et par conséquent au log de réduction serait certainement augmentée.

Pour ce qui est des limites du Chapitre 2 sur l'élaboration des méthodes de détection, il est certain dès le départ que seulement les bactéries et certaines levures et moisissures ont été inclus, ce qui fait en sorte que le protocole est toujours incomplet afin de confirmer sans l'ombre d'un doute l'absence des autres microorganismes. Cependant, il faut encore se rappeler que la recherche de contaminants en animaux axénique doit être représentative de leurs chances d'infiltration dans les cages. Comme mentionné précédemment, les bactéries, levures et moisissures sont les organismes qui ont le plus de chances d'entrer dans les cages (Nicklas et al., 2015; Schoeb et al., 2017). Par contre, l'utilisation combinée des méthodes développées dans cet ouvrage peut potentiellement permettre d'isoler les autres types de microorganismes si on se fie aux méthodes utilisées par d'autres auteurs de rapports axéniques (Karaman, 2015; Nicklas et al., 2015). En effet, les parasites étant recherchés en microscopie, il est très fort probable que la méthode développée permette également de les détecter. Par contre, en l'absence de ce type de contamination, il est certain que cette hypothèse ne pourra être confirmée qu'en analysant les résultats issus d'une contamination volontaire. Pour ce qui est autres types de microorganismes comme les virus et les *Archaea*, leur croissance implique des défis rendant l'utilisation de ce type de méthode très limitante (conditions très rigoureuses de croissance pour les *Archaea* méthanogènes par exemple).

C'est entre autres pour cette raison que les méthodes de biologie moléculaire sont priorisées pour ce type de microorganismes. Par contre, les virus étant très différents les uns des autres et pouvant s'intégrer dans certains cas dans le génome des animaux, ils ne peuvent pas être détectés de manière universelle comme c'est le cas des bactéries, mais de manière spécifique pour chaque virus dont l'absence est cruciale à un protocole. Pour les *Archaea*, le seul protocole axénique ayant proposé leur détection est celui de Packey et ses collaborateurs. Par contre, sachant que les *Archaea* sont parmi les microorganismes les plus présents dans la flore intestinale des souris (Packey et al., 2013; Samuel and Gordon, 2006), il est probable que, tout comme démontré pour les bactéries au Chapitre 2, les *Archaea* intestinales des animaux non-axéniques hébergés dans d'autres salles de l'animalerie puissent également être transportées jusque dans les locaux non-axéniques. À cet effet, l'utilisation périodique d'animaux sentinelles contaminés avec des microorganismes plus rares et/ou difficiles à détecter pourrait être un bon ajout afin de confirmer quelque fois par années l'efficacité des mesures de détection utilisées et confirmer le statut axénique des autres animaux hébergés.

Finalement, une limite à considérer pour l'ensemble des avancements scientifiques de cet ouvrage constitue l'infrastructure d'hébergement choisie. En effet, seulement l'Isocage a été utilisée afin de vérifier l'efficacité des mesures de précautions et non pas tous les modèles disponibles sur le marché. Ceux-ci, comme démontré dans l'introduction, varient énormément les uns des autres et possèdent tous des particularités techniques. Il serait par contre possible d'utiliser les méthodes développées en les modifiant légèrement. En effet, sachant que la majorité des matériaux introduits dans un isolateur sont fumigés dans une chambre de transfert avant leur entrée, cette étape pourrait remplacer le bassin d'immersion, rendant possible l'entrée des boîtes de milieux de culture. Par contre, un profil de contamination similaire à celui développé à la section 3.5.1 devrait être élaboré afin de s'assurer que les échantillons de fèces sont toujours les plus représentatifs d'une contamination pour ce type d'infrastructure d'isolement. Le comportement d'une contamination dans le temps dans un isolateur lors d'une contamination, devrait également être validé afin de confirmer la capacité des méthodes de détection à détecter les contaminants. Par contre, plusieurs facteurs dans l'échantillonnage devraient être comparés



dont dans quelles cages sélectionner les échantillons ou simplement confirmer que continuer à faire un échantillonnage groupé de toutes les cages est la manière la plus efficace.

## Conclusion et perspectives

En conclusion, ce projet de maîtrise avait pour buts de gérer le risque de contamination associé à l'Isocage en optimisant la désinfection par immersion, en déterminant l'efficacité des mesures de précautions axéniques et en développant, validant et optimisant des mesures de détection des contaminants. Afin d'y parvenir, la gestion des risques en animalerie axénique a été étudiée en obtenant la charge microbienne à la surface de cages hébergeant des animaux axéniques entre deux changements de cages; en déterminant l'efficacité sporicide de désinfectant dans le temps à différentes concentrations; en estimant le temps d'immersion optimal selon le désinfectant et sa concentration; et finalement en validant l'efficacité des mesures de précautions axéniques en comparant la charge microbienne à la surface de cages provenant de locaux axéniques et non axéniques. Par la suite, la ou les méthodes les plus efficaces afin de détecter une contamination microbienne en condition axénique ont été déterminées en sélectionnant le ou les échantillon(s) le(s) plus représentatif(s) d'une contamination pour trois différentes méthodes de détection microbienne (culture, microscopie et biologie moléculaire); et en testant *in situ* l'efficacité des méthodes optimisées à détecter une contamination microbienne artificielle volontaire dans le temps.

Le Chapitre 1 sur la gestion des risques en condition axénique a permis de confirmer l'efficacité des mesures de précaution axéniques en salle axénique qui contenait 1000 fois moins de microorganismes à la surface de ses cages qu'une salle non-axénique. Ce chapitre a également démontré que les bactéries du genre *Staphylococcus* est celui le plus communément retrouvé dans les salles axéniques et non axéniques d'une animalerie de recherche. Le temps de désinfection par trempage a également été obtenu, celui-ci visant une diminution microbienne de 2.5 Log par cage, résultant en un temps de 3 minutes pour des concentrations de MB-10 de 75 ppm et 100 ppm, 4 minutes pour 50 ppm, et au-delà de 5 minutes pour le Virkon™.

Le Chapitre 2 portant sur la détection de contaminants a permis de d'obtenir trois différentes méthodes de détection de contaminants microbiologiques optimisées pour les Isocages. Il a démontré que pour les trois méthodes de culture (BHI, jusqu'à 7 jours, 37°C aérobie, 25°C aérobie et 30°C anaérobie), microscopie (dilution d'une fèces fraîche dans 1mL d'eau stérile et montage humide) et la biologie moléculaire (qPCR, amorces universelles), les échantillons de fèces étaient suffisants afin de détecter une contamination. En addition, la culture d'écouvillons de surface d'IBS peut être pertinente afin d'agir comme contrôle de manipulation technique en culture. Les résultats de l'expérience *in situ* suggèrent que la culture et la biologie moléculaire peuvent détecter jusqu'à 100% des événements de contaminations, tandis que la microscopie seule peut engendrer des résultats erronés en l'absence de personnel qualifié.

À la lumière des résultats obtenus aux Chapitre 1 et 2, ainsi que des éléments mentionnés dans la discussion générale du Chapitre 3, il est juste d'affirmer que toutes les hypothèses élaborées dans le cadre de ce mémoire se sont révélées être exactes. En effet, il a premièrement été possible de diminuer les coûts associés aux animaux axéniques en optimisant la désinfection chimique des cages par immersion, qui est passée de 200 ppm pendant 5 minutes à 75 ppm pendant 3 minutes, ainsi qu'en optimisant les méthodes de détection microbienne en sélectionnant les échantillons les plus représentatifs d'une contamination microbienne, soit les fèces. Deuxièmement, les tests de quantification microbienne du Chapitre 1 ont permis de démontrer qu'il y avait une quantité moindre de microorganismes à la surface des cages d'un local axéniques comparativement à un non-axénique, pouvant signifier que les méthodes de précaution utilisées sont efficaces. Troisièmement, le Chapitre 2 a permis de démontrer que l'utilisation simultanée de différentes méthodes de détection permettra de détecter plus efficacement une contamination microbienne dans des Isocages hébergeant des animaux axéniques. Finalement, la discussion du Chapitre 3 a permis de tracer un profil coûts, bénéfiques et risques en évaluant l'efficacité des méthodes de détection à démontrer une contamination, ainsi qu'en évaluant les besoins des chercheurs selon la durée d'un protocole, la fréquence d'ouverture des cages et le niveau de qualité microbiologique désiré.

La suite du projet de maîtrise pourrait consister en l'élaboration de méthodes de détection applicables aux autres microorganismes existants, dont les levures, moisissures, *Archaea*, parasite, virus, etc. La présence de ces microorganismes n'étant pas vérifiée par tous les utilisateurs, il n'existe pas de données répertoriées quant à leur fréquence de contamination chez des animaux axéniques. Par le fait même, il serait intéressant de tester leur capacité à coloniser des animaux axéniques afin de vérifier la possibilité de les retrouver en faible concentration chez les animaux, de même que leur résistance aux désinfectants utilisés. Il serait également intéressant de valider l'efficacité des méthodes de détection développées dans un contexte utilisant des isolateurs traditionnels. Finalement, un programme standardisé de détection microbienne générale pourrait alors être mis sur pied, applicable selon l'usage d'un isolateur traditionnel ou au niveau de la cage. Il reste donc encore beaucoup de défis à relever pour la surveillance de contaminants en animalerie axéniques, mais ils ne peuvent être que surmontables.

## Bibliographie

Alfa, M.J., E. Lo, A. Wald, C. Dueck, P. DeGagne, and G.K.M. Harding. 2010. Improved eradication of *Clostridium difficile* spores from toilets of hospitalized patients using an accelerated hydrogen peroxide as the cleaning agent. *BMC Infect. Dis.* 10:9.

Allentown. 2019. Sentry spp™ mouse sealed positive pressure ivc. <https://www.allentowninc.com/rodent-housing/> Consulté le 17 novembre 2020.

Andersen, B.M., M. Rasch, K. Hochlin, F.H. Jensen, P. Wismar, and J.E. Fredriksen. 2006. Decontamination of rooms, medical equipment and ambulances using an aerosol of hydrogen peroxide disinfectant. *J. Hosp. Infect.* 62:149-155.

Armbruster, D.A., and T. Pry. 2008. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev.* 29 Suppl 1:S49-S52.

Arvidsson, C., A. Hallén, and F. Bäckhed. 2012. Generating and analyzing germ-free mice. Vol. 2.

Atlas, R.M., R. Bartha, and D. Atlas. 1998. Microbial ecology: Fundamentals and applications. Benjamin/Cummings.

Bach, H.J., A. Hartmann, M. Schloter, and J.C. Munch. 2001. PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. *J. Microbiol. Methods.* 44:173-182.

Bäckhed, F., H. Ding, T. Wang, L.V. Hooper, G.Y. Koh, A. Nagy, C.F. Semenkovich, and J.I. Gordon. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:15718-15723.

Basic, M., and A. Bleich. 2019. Gnotobiotics: Past, present and future. *Lab. Anim.* 53:232-243.

Bayer, F., S. Ascher, G. Pontarollo, and C. Reinhardt. 2019. Antibiotic treatment protocols and germ-free mouse models in vascular research. *Front. Immunol.* 10:7.

Belkaid, Y., and T.W. Hand. 2014. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 157:121-141.

Bergey, D.H., N.R. Krieg, and J.G. Holt. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Catanzaro, R., M.G. Anzalone, F. Calabrese, M. Milazzo, M.L. Capuana, A. Italia, S. Occhipinti, and F. Marotta. 2015. The gut microbiota and its correlations with the central nervous system disorders. *Panminerva Medica*. 57:127-143.

Coates, R., J. Moran, and M.J. Horsburgh. 2013. Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. *Future Microbiology*. 9:75-91.

Corning, B.F., and N.S. Lipman. 1991. A comparison of rodent caging systems based on microenvironmental parameters. *Lab Anim Sci*. 41:498-503.

Corning, B.F., and N.S. Lipman. 1992. The effects of a mass air displacement unit on the microenvironmental parameters within isolator cages. *Lab Anim Sci*. 42:91-93.

Faith, J.J., F.E. Rey, D. O'Donnell, M. Karlsson, N.P. McNulty, G. Kallstrom, A.L. Goodman, and J.I. Gordon. 2010. Creating and characterizing communities of human gut microbes in gnotobiotic mice. *The ISME Journal*. 4:1094-1098.

Flynn, R.J. 1968. A new cage cover as an aid to laboratory rodent disease control. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*. 129:714-717.

Fontaine, C.A., A.M. Skorupski, C.J. Vowles, N.E. Anderson, S.A. Poe, and K.A. Eaton. 2015. How free of germs is germ-free? Detection of bacterial contamination in a germ free mouse unit. *Gut microbes*. 6:225-233.

Gasparini, R., T. Pozzi, R. Magnelli, D. Fatighenti, E. Giotti, G. Poliseno, M. Pratelli, R. Severini, P. Bonanni, and L. De Feo. 1995. Evaluation of in vitro efficacy of the disinfectant Virkon. *European Journal of Epidemiology*. 11:193-197.

Gouvernement du Canada. 2018. Chapitre 11 - Enceintes de sécurité biologique, <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/normes-lignes-directrices-canadiennes-biosecurite/guide-deuxieme-edition/chapitre-11-15.html> (Consulté le 17 novembre 2020).

Gustafsson, B.E. 1946. Germ-free rearing of rats: Preliminary report. *Acta anatomica*. 2:376-391.

- Gustafsson, B.E. 1948. Germ-free rearing of rats: General technique. Berlingska boktryckeriet.
- Gustafsson, B.E. 1959. Lightweight stainless steel systems for rearing germfree animals. *Ann.NY Acad.Sci.* 78:17-28.
- Hartmann, P., H.K. Chu, Y. Duan, and B. Schnabl. 2019. Gut microbiota in liver disease: too much is harmful, nothing at all is not helpful either. *Am. J. Physiol.-Gastroint. Liver Physiol.* 316:G563-G573.
- Hecht, G., C. Bar-Nathan, G. Milite, I. Alon, Y. Moshe, L. Greenfeld, N. Dotsenko, J. Suez, M. Levy, C.A. Thaïss, H. Dafni, E. Elinav, and A. Harmelin. 2014. A simple cage-autonomous method for the maintenance of the barrier status of germ-free mice during experimentation. *Lab. Anim.* 48:292-297.
- Hessler, J. 1999. Environmental improvements in laboratory animal science: Caging systems, equipment, and facility design. *Fifty Years of Laboratory Animal Science.*
- Hinenoya, A., S.P. Awasthi, N. Yasuda, A. Shima, H. Morino, T. Koizumi, T. Fukuda, T. Miura, T. Shibata, and S. Yamasaki. 2015. Chlorine dioxide is a better disinfectant than sodium hypochlorite against multi-drug resistant staphylococcus aureus, pseudomonas aeruginosa, and acinetobacter baumannii. *Japanese journal of infectious diseases.* 68:276-279.
- Hirsjärvi, P.A., and T.U. Väliäho. 1987. Microclimate in two types of rat cages. *Lab. Anim.* 21:95-98.
- Hornig, K.J., B.A. Burgess, N.T. Saklou, V. Johnson, A. Malmlov, D.C. Van Metre, P.S. Morley, and S.R. Byers. 2016. Evaluation of the efficacy of disinfectant footmats for the reduction of bacterial contamination on footwear in a large animal veterinary hospital. *J. Vet. Intern. Med.* 30:1882-1886.
- Huerkamp, M.J., and N.D. Lehner. 1994. Comparative effects of forced-air, individual cage ventilation or an absorbent bedding additive on mouse isolator cage microenvironment. *Contemporary topics in laboratory animal science.* 33:58-61.
- Iida, N., A. Dzutsev, C.A. Stewart, L. Smith, N. Bouladoux, R.A. Weingarten, D.A. Molina, R. Salcedo, T. Back, S. Cramer, R.M. Dai, H. Kiu, M. Cardone, S. Naik, A.K. Patri, E. Wang, F.M. Marincola, K.M. Frank, Y. Belkaid, G. Trinchieri, and R.S. Goldszmid. 2013. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science.* 342:967-970.

- Jiang, C.M., P.R. Huang, Z. Liu, and B. Zhao. 2017. The gut microbiota and alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 58:1-15.
- Kamada, N., S.-U. Seo, G.Y. Chen, and G. Núñez. 2013. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology.* 13:321.
- Karaman, M. 2015. Microbiological standardization in small laboratory animals and recommendations for the monitoring. *J. Clin. Anal. Med.* 6:673-677.
- Karbach, S.H., T. Schonfelder, I. Brandao, E. Wilms, N. Hormann, S. Jackel, R. Schuler, S. Finger, M. Knorr, J. Lagrange, M. Brandt, A. Waisman, S. Kossmann, K. Schafer, T. Munzel, C. Reinhardt, and P. Wenzel. 2016. Gut microbiota promote angiotensin ii-induced arterial hypertension and vascular dysfunction. *J. Am. Heart Assoc.* 5:15.
- Keller, G.L., S.F. Mattingly, and F.B. Knapke, Jr. 1983. A forced-air individually ventilated caging system for rodents. *Lab Anim Sci.* 33:580-582.
- Kirk, R.G. 2012. "Life in a germ-free world": isolating life from the laboratory animal to the bubble boy. *Bull Hist Med.* 86:237-275.
- Kraft, L.M. 1958. Observations on the control and natural history of epidemic diarrhea of infant mice (EDIM). *The Yale journal of biology and medicine.* 31:121-137.
- Kraft, L.M., R.F. Pardy, D.A. Pardy, and H. Zwickel. 1964. Practical control of diarrheal disease in a commercial mouse colony. *Lab Anim Care.* 14:16-19.
- Kreske, A.C., J.H. Ryu, and L.R. Beuchat. 2006. Evaluation of chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer for effectiveness in killing *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in suspensions, on the surface of stainless steel, and on apples. *Journal of food protection.* 69:1892-1903.
- La Duc, M.T., A. Dekas, S. Osman, C. Moissl, D. Newcombe, and K. Venkateswaran. 2007. Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments. *Applied and Environmental Microbiology.* 73:2600-2611.
- Laflamme, C., J. Ho, M. Veillette, M.C. de Latremaille, D. Verreault, A. Meriaux, and C. Duchaine. 2005. Flow cytometry analysis of germinating *Bacillus* spores, using membrane potential dye. *Arch. Microbiol.* 183:107-112.



Lahiri, S., H. Kim, I. Garcia-Perez, M.M. Reza, K.A. Martin, P. Kundu, L.M. Cox, J. Selkrig, J.M. Posma, H.B. Zhang, P. Padmanabhan, C. Moret, B. Gulyas, M.J. Blaser, J. Auwerx, E. Holmes, J. Nicholson, W. Wahli, and S. Pettersson. 2019. The gut microbiota influences skeletal muscle mass and function in mice. *Sci. Transl. Med.* 11:15.

Lange, M.E., R.R.E. Uwiera, and G.D. Inglis. 2019. Housing gnotobiotic mice in conventional animal facilities. *Current protocols in mouse biology.* 9:e59.

Lavin, R., N. DiBenedetto, V. Yeliseyev, M. Delaney, and L. Bry. 2018. Gnotobiotic and conventional mouse systems to support microbiota based studies. *Curr Protoc Immunol.* 121:e48.

Lindsey, J.R., and H.J. Baker. 2006. Chapter 1 - historical foundations. *In The Laboratory Rat (Second Edition).* M.A. Suckow, S.H. Weisbroth, and C.L. Franklin, editors. Academic Press, Burlington. 1-52.

Lipman, N.S. 1999. Isolator rodent caging systems (state of the art): A critical view. *Contemporary topics in laboratory animal science.* 38:9-17.

Lipman, N.S., B.F. Corning, and M. Saifuddin. 1993. Evaluation of isolator caging systems for protection of mice against challenge with mouse hepatitis virus. *Lab Anim.* 27:134-140.

Lipman, N.S., C.E. Newcomer, and J.G. Fox. 1987. Rederivation of MHV and MEV antibody positive mice by cross-fostering and use of the microisolator caging system. *Lab Anim Sci.* 37:195-199.

Lockyer, N. 1897. *Nature.* Macmillan Journals Limited.

Marchesi, J.R., T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom, and W.G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology.* 64:795-799.

McArthur, J.V. 2006. *Microbial ecology: An evolutionary approach.* Elsevier Science.

McGarrity, G.J., and L.L. Coriell. 1976. Maintenance of axenic mice in open cages in mass air flow. *Lab Anim Sci.* 26:746-750.

Mickelsen, O. 1962. Nutrition-germfree animal research. *Annual review of biochemistry.* 31:515-548.

MicroBio. 2020. Rapid microbiological test kit, [http://www.microbio.co.jp/Eng/rapid\\_microbial\\_detection\\_kit/](http://www.microbio.co.jp/Eng/rapid_microbial_detection_kit/) (Consulté le 22 novembre 2020).

Midtvedt, T., and B. Gustafsson. 2005. Digestion of dead bacteria by germ-free rats. *Current Microbiology*. 6:13-15.

Miyakawa, M. 1959. The Miyakawa remote-control germfree rearing unit. *Ann N Y Acad Sci*. 78:37-46.

Moody, L.V., Y. Miyamoto, J. Ang, P.J. Richter, and L. Eckmann. 2019. Evaluation of peroxides and chlorine oxides as disinfectants for chemical sterilization of gnotobiotic rodent isolators. *J. Amer. Assoc. Lab. Anim. Sci*. 58:558-568.

Murakami, H. 1971. Differences between internal and external environments of the mouse cage. *Lab Anim Sci*. 21:680-684.

Nadkarni, M.A., F.E. Martin, N.A. Jacques, and N. Hunter. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology (Reading)*. 148:257-266.

Nicklas, W., L. Keubler, and A. Bleich. 2015. Maintaining and monitoring the defined microbiota status of gnotobiotic rodents. *Ilar j*. 56:241-249.

Niimi, K., P. Hardy, B. Bilecki, and E. Takahashi. 2019. Rearing and breeding of germ-free mice for over 1 year in a sealed positive pressure cage system. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 67:119-125.

Niimi, K., and E. Takahashi. 2019. New system to examine the activity and water and food intake of germ-free mice in a sealed positive-pressure cage. *Heliyon*. 5:e02176.

Nuttall George, H.F., and H. Thierfelder. 1897. Thierisches leben ohne bakterien im verdauungskanal. In Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie. Vol. 23. 231.

Packey, C.D., M.T. Shanahan, S. Manick, M.A. Bower, M. Ellermann, S.L. Tonkonogy, I.M. Carroll, and R.B. Sartor. 2013. Molecular detection of bacterial contamination in gnotobiotic rodent units. *Gut microbes*. 4:361-370.

Paik, J., O. Pershutkina, S. Meeker, J.J. Yi, S. Dowling, C. Hsu, A.M. Hajjar, L. Maggio-Price, and D.A. Beck. 2015. Potential for using a hermetically-sealed, positive-pressured isocage system for studies involving germ-free mice outside a flexible-film isolator. *Gut microbes*. 6:255-265.

Parashar, A., and M. Udayabanu. 2017. Gut microbiota: implications in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. 38:1-7.

Pasteur, L. 1885a. Observations de M. Pasteur, relatives à la Note précédente. *In Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*. Vol. 100. L. Pasteur, editor. Académie des sciences (France), Paris. 68.

Pasteur, L. 1885b. Sur la germination dans un sol riche en matières organiques, mais exempt de microbes. Note de M. E. Duclaux, présentée par M. Pasteur. *In Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*. Vol. 100. L. Pasteur, editor. Académie des sciences (France), Paris. 66-67.

Pleasant, J.R. 1959. Rearing germfree cesarean-born rats, mice, and rabbits through weaning. *Ann.NY Acad.Sci*. 78:116-126.

Pleasant, J.R. 1965. History of germfree animal research at lobund laboratory, biology department, university of notre dame, 1928-1965. *In Proceedings of the Indiana Academy of Science*. Vol. 75. 220-226.

Poiley, S.M. 1967. The development of an effective method for control of epizootic diarrhea in infant mice. *Lab Anim Care*. 17:501-510.

Quip Laboratories Inc. 2013. Safety data sheet (MB-10), <https://quiplabs.com/wp-content/uploads/GHS-SDS-MB-10-1.5.pdf> (Consulté le 17 novembre 2020).

Quip Laboratories Inc. 2020. MB-10 Label (1.5g), <https://quiplabs.com/wp-content/uploads/MB-10-Tablets-1-5-gram-300-Count-8-1-20141.pdf> (Consulté le 17 novembre 2020).

Ramezani, A., T.D. Nolin, I.R. Barrows, M.G. Serrano, G.A. Buck, R. Regunathan-Shenk, R.E. West, P.S. Latham, R. Amdur, and D.S. Raj. 2018. Gut colonization with methanogenic archaea lowers plasma trimethylamine n-oxide concentrations in apolipoprotein e-/- mice. *Scientific reports*. 8:11.

Raynor, T.H., W.H. Steinhagen, and T.E. Hamm, Jr. 1983. Differences in the microenvironment of a polycarbonate caging system: bedding vs raised wire floors. *Lab Anim*. 17:85-89.

Reddy, B.S., B.S. Wostmann, and J.R. Pleasants. 1968. Nutritionally adequate diets for germfree animals. *The Germfree Animal in Research, edited by Coates. Academic Press. NY & London.*

Reeb, C., R. Jones, D. Bearg, H. Bedigan, D. Myers, and B. Paigen. 1998. Microenvironment in Ventilated Animal Cages with Differing Ventilation Rates, Mice Populations, and Frequency of Bedding Changes. *Contemporary topics in laboratory animal science. 37:43-49.*

Reyniers, J.A. 1943. Introduction to the general problem of isolation and elimination of contamination. *Micrurgical and germfree methods.*

Reyniers, J.A. 1957. The control of contamination in colonies of laboratory animals by the use of germfree techniques. *In Proc. Animal Care Panel. Vol. 7. 9-29.*

Reyniers, J.A. 1958. The germfree life program of lobund institute, university of notre dame: A summation from 1928–1958. *Recent Progress in Microbiology:261-287.*

Reyniers, J.A. 1959. Design and operation of apparatus for rearing germfree animals. *Ann.NY Acad.Sci. 78:47-79.*

Ridaura, V.K., J.J. Faith, F.E. Rey, J.Y. Cheng, A.E. Duncan, A.L. Kau, N.W. Griffin, V. Lombard, B. Henrissat, J.R. Bain, M.J. Muehlbauer, O. Ilkayeva, C.F. Semenkovich, K. Funai, D.K. Hayashi, B.J. Lyle, M.C. Martini, L.K. Ursell, J.C. Clemente, W. Van Treuren, W.A. Walters, R. Knight, C.B. Newgard, A.C. Heath, and J.I. Gordon. 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science. 341:1079-U1049.*

Rosenthal, I. 1896. Nuttall u.Thierfelder, Tiersches leben ohne bakterien im verdauungskanal. *In Biologisches Centralblatt. Vol. v.16 Verlag von Georg Thieme [etc.], Leipzig [etc.]. 123-124.*

Samuel, B.S., and J.I. Gordon. 2006. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A. 103:10011-10016.*

Schichnes, D., J. Nemson, and S. Ruzin. 2006. Fluorescent staining method for bacterial endospores. *Microscope. 54.*

Schneider, H.A., and G.R. Collins. 1966. Successful prevention of infantile diarrhea of mice during an epizootic by means of a new filter cage unopened from birth to weaning. *Lab Anim Care. 16:60-71.*

Schoeb, T.R., and R.P. Orcutt. 2017. Chapter 1 - historical overview. *In* Gnotobiotics. T.R. Schoeb and K.A. Eaton, editors. Academic Press. 1-19.

Schoeb, T.R., R.J. Rahija, C. Boyd, R.P. Orcutt, and K.A. Eaton. 2017. Chapter 2 - principles of establishing and operating a gnotobiotic facility. *In* Gnotobiotics. T.R. Schoeb and K.A. Eaton, editors. Academic Press. 21-63.

Schwabe, R.F., and C. Jobin. 2013. The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 13:800-812.

Sedlacek, R.S., and K.A. Mason. 1977. Simple and inexpensive method for maintaining a defined flora mouse colony. *Lab. Anim. Sci.* 27:667-670.

Sella, S.R., L.P. Vandenberghe, and C.R. Soccol. 2015. *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications - a review. *Critical reviews in biotechnology*. 35:533-545.

Serrano, L.J. 1971. Carbon dioxide and ammonia in mouse cages: effect of cage covers, population, and activity. *Lab Anim Sci*. 21:75-85.

Simmons, M.L., C.B. Richter, J.A. Franklin, and R.W. Tennant. 1967. Prevention of infectious diseases in experimental mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126:830-837.

Sommer, F., and F. Backhed. 2013. The gut microbiota - masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:227-238.

Suckow, M.A., and H.J. Baker. 2020. Chapter 1 - historical foundations. *In* The Laboratory Rat (Third Edition). M.A. Suckow, F.C. Hankenson, R.P. Wilson, and P.L. Foley, editors. Academic Press. 3-46.

Taylor, D.M., L. Read, and D.L. Neal. 1986. Determining the viability of fecal bacteria present in germ-free mice. *Lab. Anim.* 20:22-26.

Tecniplast. 2016. Brochure : Individually ventilated cages, [https://www.tecniplast.it/usermedia/en/2016/brochures/TP\\_HOUSING\\_IVC.pdf](https://www.tecniplast.it/usermedia/en/2016/brochures/TP_HOUSING_IVC.pdf) Consulté (Consulté le 17 novembre 2020).

Tecniplast. 2017a. IBS - Isocage biosafety station, <https://www.tecniplast.it/en/product/ibs-isocage-biosafety-station.html> (Consulté le 17 novembre 2020).

Tecniplast. 2017b. Isocage p - bioexclusion system, <https://www.tecniplast.it/en/product/isocage-isolator-at-cage-level.html> (Consulté le 17 novembre 2020).

Tecniplast. 2018. Brochure : Laminar flow for all your needs, [https://www.tecniplast.it/usermedia/en/2016/brochures/TP\\_LAMINARFLOW.pdf](https://www.tecniplast.it/usermedia/en/2016/brochures/TP_LAMINARFLOW.pdf) (Consulté le 17 novembre 2020).

Thaiss, C.A., N. Zmora, M. Levy, and E. Elinav. 2016. The microbiome and innate immunity. *Nature*. 535:65.

Tlaskalova-Hogenova, H., R. Stepankova, H. Kozakova, T. Hudcovic, L. Vannucci, L. Tuckova, P. Rossmann, T. Hrnčir, M. Kverka, Z. Zakostelska, K. Klimesova, J. Pribylova, J. Bartova, D. Sanchez, P. Fundova, D. Borovska, D. Srutkova, Z. Zidek, M. Schwarzer, P. Drastich, and D.P. Funda. 2011. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell. Mol. Immunol.* 8:110-120.

Trexler, P.C. 1959. The use of plastics in the design of isolator systems. *Ann N Y Acad Sci.* 78:29-36.

Trexler, P.C. 1999. Development of gnotobiotics and contamination control in laboratory animal science.

Trexler, P.C., and E.D. Barry. 1958. Development of inexpensive germfree animal rearing equipment. *In Proc. Anim. Care Panel.* Vol. 8. 75-77.

Trexler, P.C., and L.I. Reynolds. 1957. Flexible film apparatus for the rearing and use of germfree animals. *Applied microbiology.* 5:406.

Université de Toronto. 2020. Germfree core, <https://www.dcm.utoronto.ca/germfree-core> (Consulté le 17 novembre 2020).

van der Waaij, D., and A.H. Andreas. 1971. Prevention of airborne contamination and cross-contamination in germ-free mice by laminar flow. *J Hyg (Lond).* 69:83-89.

Wagner, M. 1959. Determination of germfree status. *Ann.NY Acad.Sci.* 78.

Wang, Z.N., E. Klipfell, B.J. Bennett, R. Koeth, B.S. Levison, B. Dugar, A.E. Feldstein, E.B. Britt, X.M. Fu, Y.M. Chung, Y.P. Wu, P. Schauer, J.D. Smith, H. Allayee, W.H.W. Tang, J.A. DiDonato,

A.J. Lusis, and S.L. Hazen. 2011. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 472:57-U82.

Watson, J.D., and F.H.C. Crick. 1953. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 171:737-738.

White, T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315-322.

Wu, D.Y., G.N. Joiner, and A.R. McFarland. 1985. A forced-air ventilation system for rodent cages. *Lab Anim Sci*. 35:499-504.

Yoshihito, F., K. Mieko, M. Koji, S. Hiroyuki, I. Teruo, T. Kouichiro, and S. Yasuo. 2004. Sensitive detection of bacteria and spores using a portable bioluminescence atp measurement assay system distinguishing from white powder materials. *Journal of Health Science*. 50:126-132.

## Annexe A : Illustration de l'appareil axénique de Gustafsson

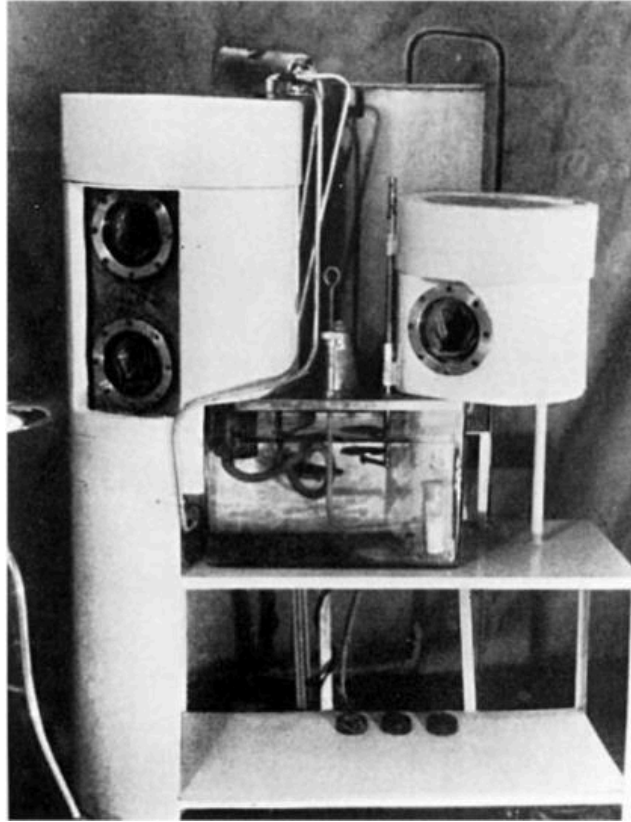


Image de côté du premier isolateur de Gustafsson schématisé à la Figure 1. (Illustration tirée de Gustafsson, 1946)

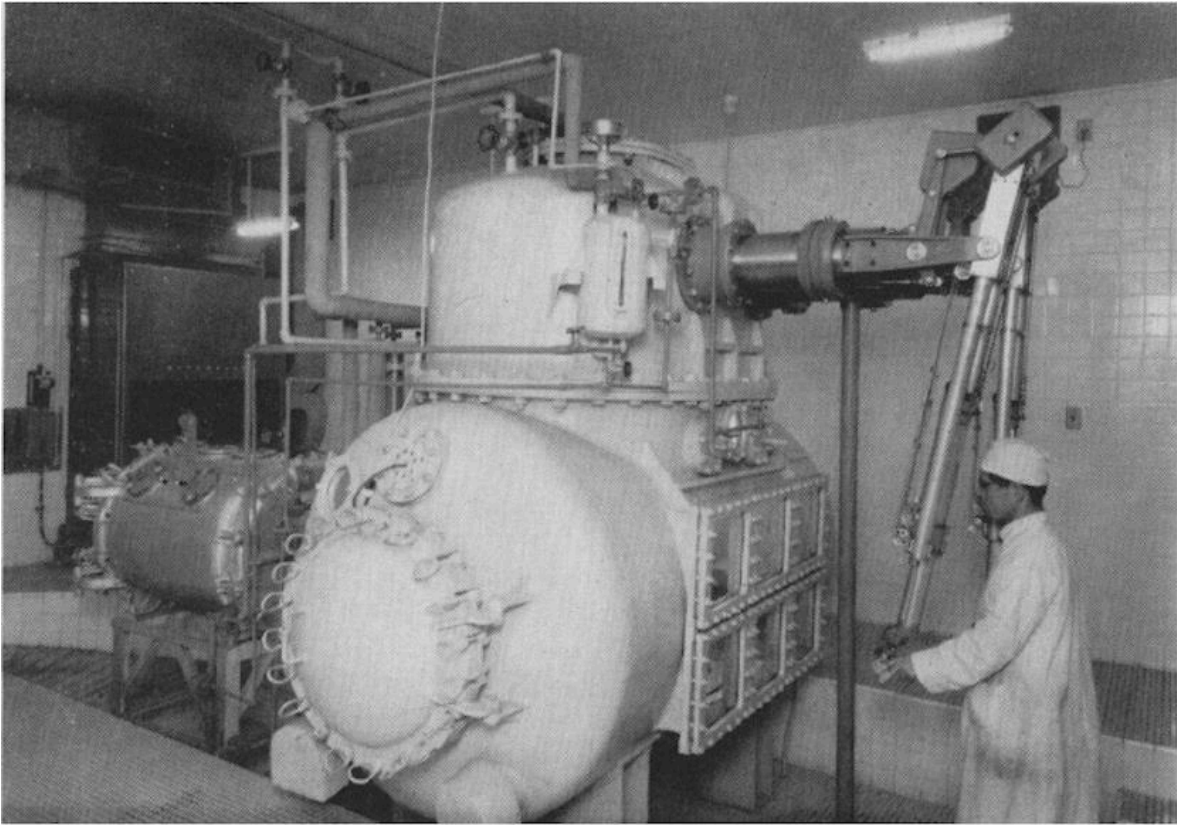


## **Annexe B : Illustration de l'intérieur de l'isolateur de Gustafsson**



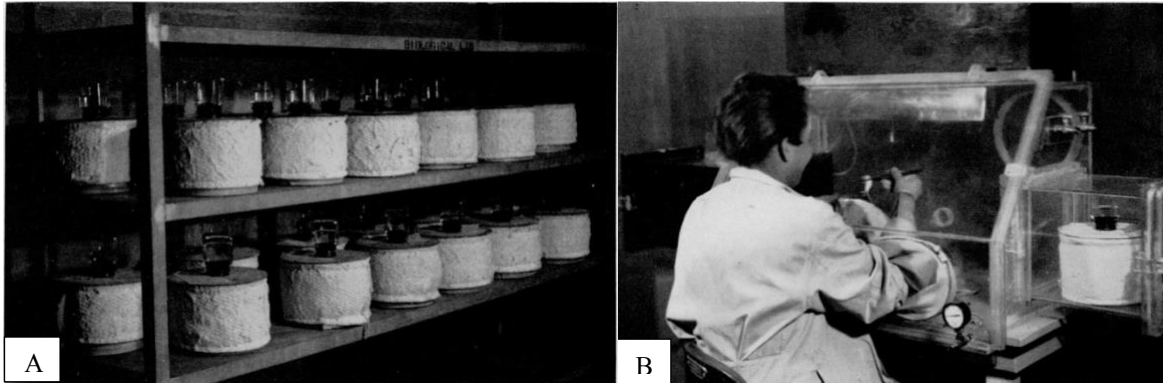
Vue du dessus de l'intérieur de l'isolateur large de Gustafsson schématisé à la Figure 2.  
(Image tirée de Gustafsson, 1959)

## Annexe C : Illustration de l'isolateur avec bras télécommandés de Miyakawa



Isolateur sans germe avec bras télécommandés M-57, schématisé à la Figure 5. (Image tirée de Miyakawa, 1959)

## Annexe D : Illustrations de la hotte bactériologique de transfert et d'un espace de rangement pour cages filtrantes de Kraft



A : Cages filtrantes disposées sur des grilles de rangement. Celles-ci contiennent des souris infectées ou non (témoins). (Illustration tirée de Kraft, 1958)

B : Observation d'une souris dans la hotte bactériologique de transfert. Une cage est visible dans la serrure d'entrée à la droite de la hotte. Le verrou de sortie se trouve à gauche et le boîtier du filtre d'échappement se trouve sur le dessus de la hotte. Le ventilateur d'extraction est au-dessus du boîtier de filtre, mais n'est pas visible sur l'image. (Illustration tirée de Kraft, 1958)

## Annexe E : Hotte de transfert en contre-plaqué de Kraft

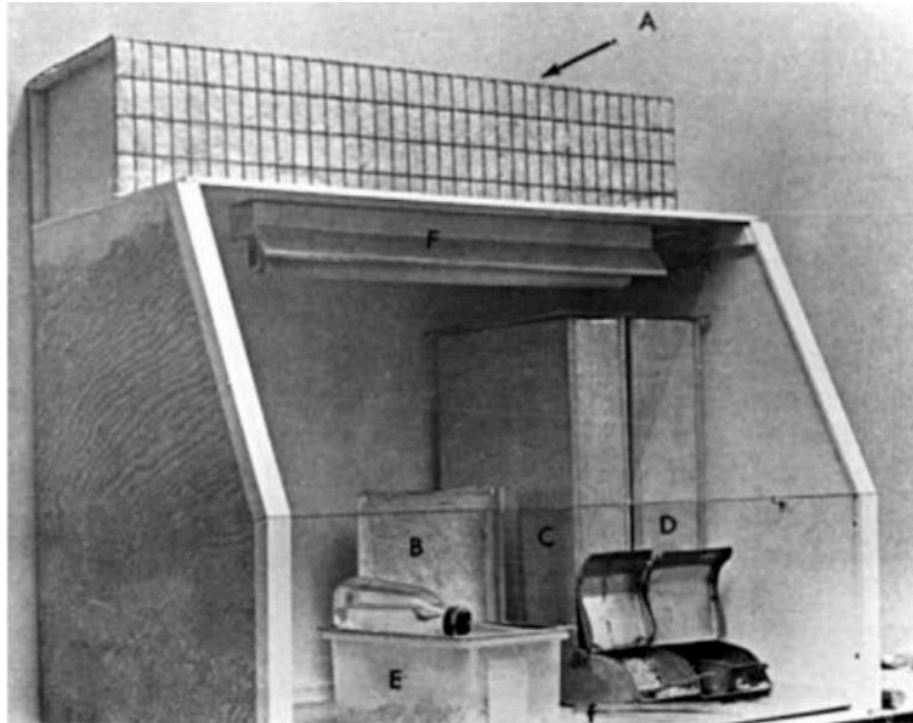


Image de la hotte de transfert pour charger les couvercles des cage filtrantes. A, boîtier de filtration contenant un ventilateur; B, couvercle de cage; C, D, trémies d'alimentation; E, cage à souris régulière; F, lampe fluorescente; f, pinces dans un tube protecteur. (Illustration tirée de Kraft et al, 1964)

## **Annexe F : Surface de travaille mobile à ventilation de masse filtrée HEPA.**



À utiliser dans le cadre d'un système de micro-isolation pour changer les cages ou lors de toutes procédures nécessitant l'ouverture de la cage. (Illustration tirée de Hessler, 1999)

## Annexe G : Cage Sentry SPP et le portoir Allentown



Le Sentry SPP utilise un système à pression positive scellée (SPP). L'air passant à travers le portoir à cage du système SPP est filtré HEPA et passe ensuite à travers une deuxième cartouche HEPA au niveau de la cage. Lorsque la cage est retirée du système de portoir, les ports de la cage et du portoir sont simultanément scellés.

Le SPP est doté d'un système de circulation d'air utilisant un ventilateur conçu pour fournir un flux d'air unidirectionnel en un seul passage. En étant attaché à une cage occupée, accepte des données en temps réel pour effectuer des ajustements automatiques pour compenser à la fois la charge du filtre HEPA en rack et intra-cage, garantissant un flux d'air constant. Il est aussi équipé d'une batterie de secours ayant 10 heures d'économie de batterie

Informations et image tirés du site web de la compagnie (Allentown, 2019).

## Annexe H : Portoir d'hébergement pour Isocages et IBS



Le portoir d'hébergement, à droite, peut contenir 30, 36, 60 ou 72 Isocages. Il offre une densité de cage semblable à celle de IVC. Il possède un écran tactile et un port USB pour l'exportation de données. Le portoir possède également une batterie de secours pouvant fournir une ventilation adéquate pendant plus de 24 heures en cas de panne de courant, ainsi que deux ventilateurs fonctionnant simultanément en prévision de panne de ventilateur.

L'IBS, à gauche, est équipée d'une surface de travail et d'une paire de gants coulissants entre lesquels il y a un flux d'air laminaire. Il comprend également un bassin d'immersion pour la désinfection chimique à sa droite, ainsi qu'un second port d'entrée à sa gauche (non visible sur cette photo). Cette version de l'IBS ne comporte pas de lumière ultra Violette.

Informations tirées de la brochure de la compagnie (Tecniplast, 2016), photo tirée du site web de l'Université de Toronto (Université de Toronto, 2020)