

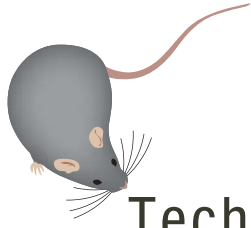
Techniques d'ingénierie reproductive de la Souris

Manuel Technique

Naomi Nakagata

Version française
Fabien Delerue





Techniques d'Ingénierie Reproductive de la **Souris**

Manuel Technique
Naomi Nakagata
En collaboration avec Shuuji Tsuchiyama
Division d'ingénierie reproductive
Centre de Ressources Animales et de Développement (CARD)
Université de Kumamoto, Japon

Version française : Fabien Delerue

3ème édition
Publié par COSMO BIO CO., LTD.
Toyo-Ekimae Bldg., 2-20, Toyo 2-Chome, Koto-ku, Tokyo 135-0016,
Japon
Téléphone; +81-3-5632-9617
Conception de la couverture: COSMO BIO CO., LTD.

Droits d'auteur© 2018 Naomi Nakagata
TOUS DROITS RESERVES. IMPRIME AU JAPON
Ce manuel n'est pas destiné à la vente.
La reproduction (même partielle), la sauvegarde dans un système de
données ou la transmission sous quelque forme ou par n'importe
quel moyen électronique, mécanique, par photocopie,
enregistrement ou autres, sont strictement interdites sans accord
préalable de l'auteur.

Préface

Ces dernières années, la production de souris génétiquement modifiées s'est largement accrue. De plus, les progrès réalisés dans le domaine des techniques d'altération des génomes (par TALEN et CRISPR/Cas9) appliquées en biologie moléculaire sont sans précédent. A tel point qu'une lignée de souris génétiquement modifiées est désormais aisément produite en quelques mois. Une telle production a largement été rendue possible grâce à l'apport de techniques d'ingénierie reproductive de la souris telles que la fécondation *in vitro*, la congélation d'embryons et de sperme, et les techniques de transfert d'embryons. Ces techniques périphériques sont devenues incontournables, et leur utilisation ne cesse d'augmenter.

Par conséquent, plusieurs manuels techniques faisant référence à certaines techniques d'ingénierie reproductive de la souris ont été publiés, mais il n'existe pas encore de manuel complet décrivant en détail toutes les techniques de pointe nécessitant l'utilisation de microscope stéréoscopique.

C'est dans cette optique que nous avons créé ce manuel de techniques d'ingénierie reproductive de la souris, dans un souci de compréhension par tous. Ce manuel contient de nombreuses illustrations graphiques, photos et vidéos, et les explications étape par étape qui les accompagnent se veulent les plus complètes possibles, dans un souci de clarté. Nous espérons que ce manuel deviendra le guide de référence pour tous les étudiants, techniciens, chercheurs, ou toute personne désireuse d'étudier les techniques d'ingénierie reproductive de la souris.

Naomi Nakagata

TABLE DES MATIERES

Chapitre 1 Fécondation *In Vitro* (FIV)

1-1 Préparation et assemblage de pipettes pour la manipulation d'embryons	4
1-2 Fécondation <i>In Vitro</i> (FIV)	6
1-3 Fécondation <i>In Vitro</i> (FIV) après Ultra-Superovulation	12

Chapitre 2 Transport de sperme

2-1 Collection et transport réfrigéré de queues d'épididymes	14
2-2 Fécondation <i>In Vitro</i> avec sperme épидидymaire réfrigéré	18

Chapitre 3 Congélation de sperme

3-1 Congélation de spermatozoïdes murins	20
3-2 Fécondation <i>In Vitro</i> avec spermatozoïdes congelés	26
3-3 Méthode de ressuscitation de lignées par Fécondation <i>In Vitro</i> avec spermatozoïdes congelés	32

Chapitre 4 Préparation d'ovocytes & d'embryons

4-1 Préparation d'ovocytes microdisséqués au Laser	36
4-2 Dissection Partielle de la membrane Pellucide (DPP)	39
4-3 Collection d'embryons au stade 2 cellules	42

Chapitre 5 Transport d'ovocytes & d'embryons

5-1 Transport d'embryons réfrigérés au stade 2 cellules	46
5-2 Transport réfrigéré d'oviductes de souris contenant des embryons au stade 2 cellules	52

Chapitre 6 Congélation d'ovocytes & d'embryons

6-1 Vitrification simple d'embryons murins	54
6-2 Vitrification simple d'ovocytes murins	59
6-3 Vitrification et transport d'ovaires de souris	62

Chapitre 7 Autres techniques

7-1 Vasectomie pour la production de males stériles	64
7-2 Transfert d'embryons dans l'oviducte	66
7-3 Transfert utérin d'embryons	72
7-4 Césarienne et adoption	76

Chapitre 8 Milieux

8-1 Stockage de milieux et solutions en ampoules sous atmosphère azotée	78
8-2 Tableaux de composition des milieux	79

*  voir détails en page 90

1-1 Préparation et assemblage de pipettes pour la manipulation d'embryons

Matériel et Equipement

1. Capillaires en verre (Micropipettes calibrées; 2-000-200; Compagnie Scientifique Drummond, USA)
2. Lampe à pétrole (ou bec benzène No. RK4102; REKROW INDUSTRIAL INC.)
3. Lime
4. Hématimètre
5. Pipette Pasteur
6. Cotton
7. Tube en silicone
8. Bouchon en silicone
9. Aspirateur buccal

Procédure

Nettoyage et stérilisation des capillaires en verre

1. Immerger les capillaires en verre dans un mélange (99:1) d'éthanol à 70% et d'acide hydrochlorique concentré pendant au moins 12 heures.
2. Rincer les capillaires en verre à l'eau courante pendant au moins 3 heures.
3. Rincer les capillaires en verre 4 ou 5 fois à l'eau distillée.
4. Stériliser les capillaires en verre à 180°C pendant au moins 3 heures.

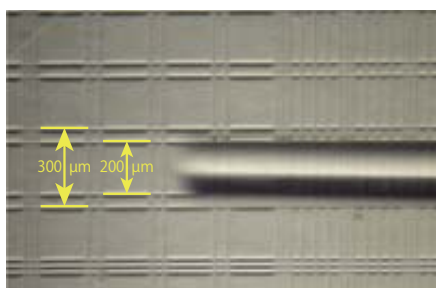
Préparation de pipettes pour la manipulation d'embryons

1. Chauffer le centre du capillaire en verre en utilisant la partie supérieure de la flamme de la lampe à pétrole. Dès que le verre commence à fondre, retirer le capillaire de la flamme et immédiatement étirer le capillaire en tirant simultanément sur les deux bouts.
2. Placer le centre du capillaire (partie fine étirée) dans la flamme et laisser fondre jusqu'à obtenir deux morceaux.
3. Ajuster la longueur du capillaire à environ 10 cm en faisant une entaille sur la partie étirée du capillaire avec une lime, puis en appuyant sur l'extrémité du capillaire pour la briser.
4. Vérifier le diamètre du bout du capillaire en utilisant un hématimètre sous le microscope.

[Lorsque le bord du capillaire est en focus]



[Lorsque l'hématimètre est en focus]



[Fabrication de pipettes pour la manipulation d'embryons] No. 01-01



Note

Capillaires et aspirateurs buccaux pré-assemblés pour la manipulation d'embryons sont disponibles à la vente chez Cosmo Bio Co., Ltd. (Embryo manipulation instrument set, Cat. No. KYD-S036)

Note

Les dimensions du capillaire dépendent du temps passé dans la flamme et du timing utilisé pour étirer le capillaire.

La fabrication de capillaires aux dimensions constantes requiert un peu de pratique.

Le diamètre externe du capillaire une fois étiré doit atteindre approximativement 200-250 μm.

- Polir et stériliser le bout du capillaire en le passant très rapidement dans la flamme. Prendre soin de ne pas rester trop longtemps dans la flamme pour ne pas boucher le capillaire.

[Bout du capillaire avant polissage]



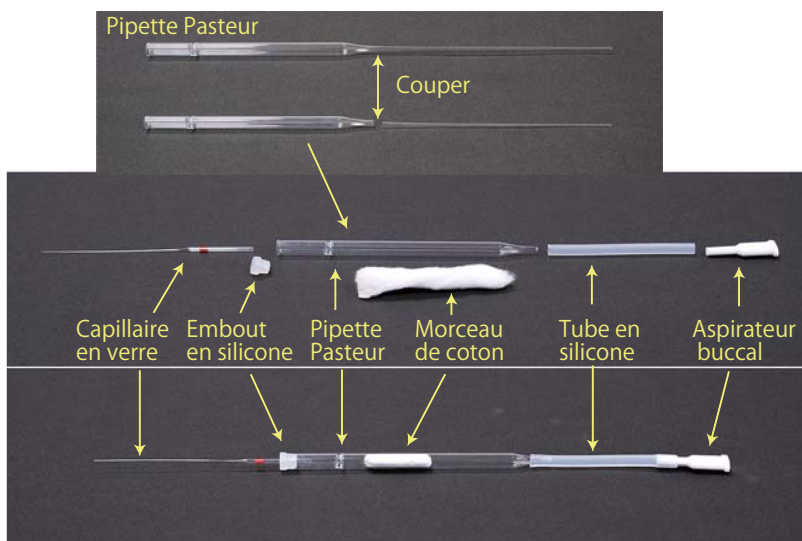
[Bout du capillaire une fois poli]

[Polissage du bout du capillaire] No. 01-02 

Assemblage des capillaires avec l'aspirateur buccal pour la manipulation d'embryons

- Couper le bout du capillaire avec une lime (en laissant approximativement 1 cm).
- Polir le bout du capillaire en le passant dans la flamme de la lampe à pétrole.
- Insérer un morceau de coton dans le capillaire.
- Insérer le bouchon en silicone du côté le plus large du capillaire.
- Enfiler un tube en caoutchouc du côté le plus fin du capillaire.
- Couper le tube en caoutchouc à une longueur convenable, et fixer l'aspirateur buccal au bout du tube.

[Capillaire et aspirateur buccal pour la manipulation d'embryons]



Manipuler les embryons

- Placer l'aspirateur buccal en bouche.
- Sous le microscope, placer le bout du capillaire dans une goutte de milieu. Laisser le liquide monter dans le capillaire par capillarité.
- Lorsque le liquide cesse de monter par capillarité, aspirer avec précaution les embryons. Pour déposer les embryons, souffler avec précaution dans le capillaire.

[Manipulation d'embryons] No. 01-03 

1-2 Fécondation *In Vitro* (FIV)

Matériel et équipement

1. PMSG (Sérum de Gonadotrophine de jument enceinte Cat. No. 80056-608; VWR SCIENTIFIC INC.) (37.5UI/mL en solution saline stérile)
2. hCG (Gonadotrophine Chorionique humaine, CG-10; Sigma) (37.5UI/mL en solution saline stérile)
3. Seringue à usage unique 1 mL
4. FERTIUP® (Milieu de Préincubation: PM, Cat. No. KYD-002-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
5. CARD MEDIUM® (Cat. No. KYD-003-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
6. mHTF (Fluide tubal humain modifié)
7. Paraffine liquide
8. Micropipettes
9. Embouts de pipettes pour la préparation des boîtes de culture
10. Embouts de pipettes pour insémination (Pipette Tip Cat. No.114; Quality Scientific Plastics)
11. Boîtes de Pétri en plastique (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
12. Ciseaux de précision
13. Une paire de forceps watchmaker's #5
14. Ciseaux à micro-ressorts (lame de 5mm)
15. Aiguille de dissection
16. Papier filtre
17. Capillaires en verre pour manipulation d'embryons
18. Microscope
19. Etuve humidifiée (37°C, 5% CO₂)

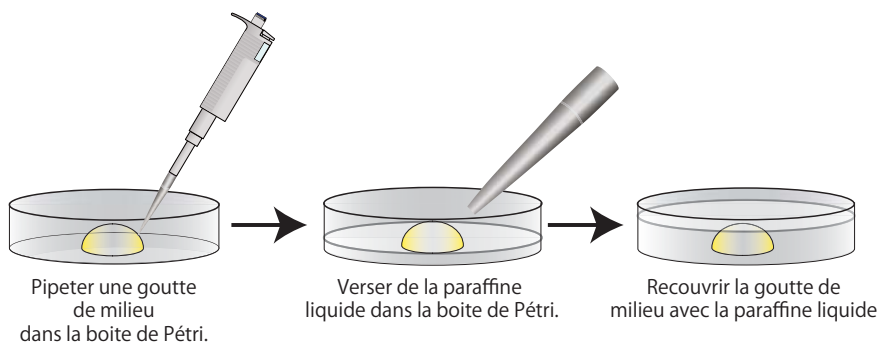
Procédure

Superovulation

1. Induire la superovulation avec 7.5UI de sérum de jument (PMSG) par femelle mature (âgées de 8-12 semaines) par injection intrapéritonéale (i.p.). (Le sérum de jument est en général injecté durant la phase lumineuse du cycle, entre 14h00 et 18h00).
2. 48 à 52 heures plus tard, injecter 7.5UI de Gonadotrophine humaine (hCG) par voie intrapéritonéale.

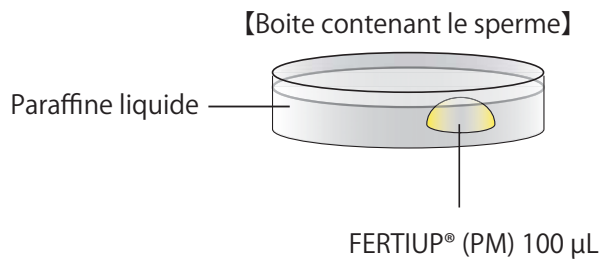
Préparation de boîtes de culture

1. Préparer les boîtes de culture comme indiqué ci-dessous and placer-les dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) pour équilibrer les milieux de culture.



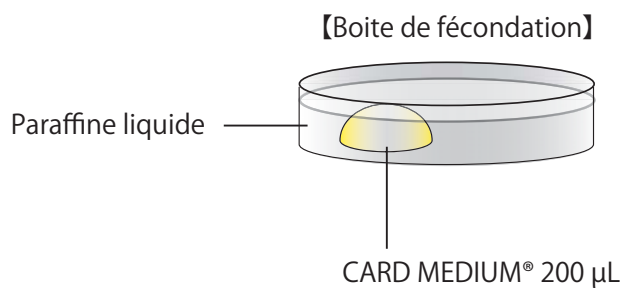
a. Boîte contenant le sperme

Placer 1 goutte (100 μL / goutte) de FERTIUP® (PM) dans une boîte de Pétri et recouvrir avec de la paraffine liquide 30 minutes avant de collecter le sperme, puis placer la boîte dans l'étuve.



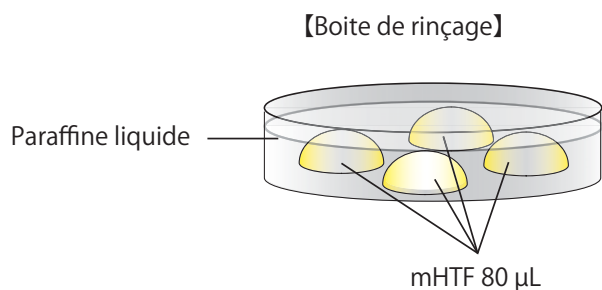
b. Boîte de fécondation

Placer 1 goutte (200 μL / goutte) de CARD MEDIUM® dans une boîte de Pétri et recouvrir avec de la paraffine liquide 10 minutes avant de collecter les ovocytes, puis placer la boîte dans l'étuve.



c. Boîte de rinçage

Placer 4 gouttes (80 μL / goutte) de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrir avec de la paraffine liquide. Placer la boîte dans l'étuve 30 minutes minimum.

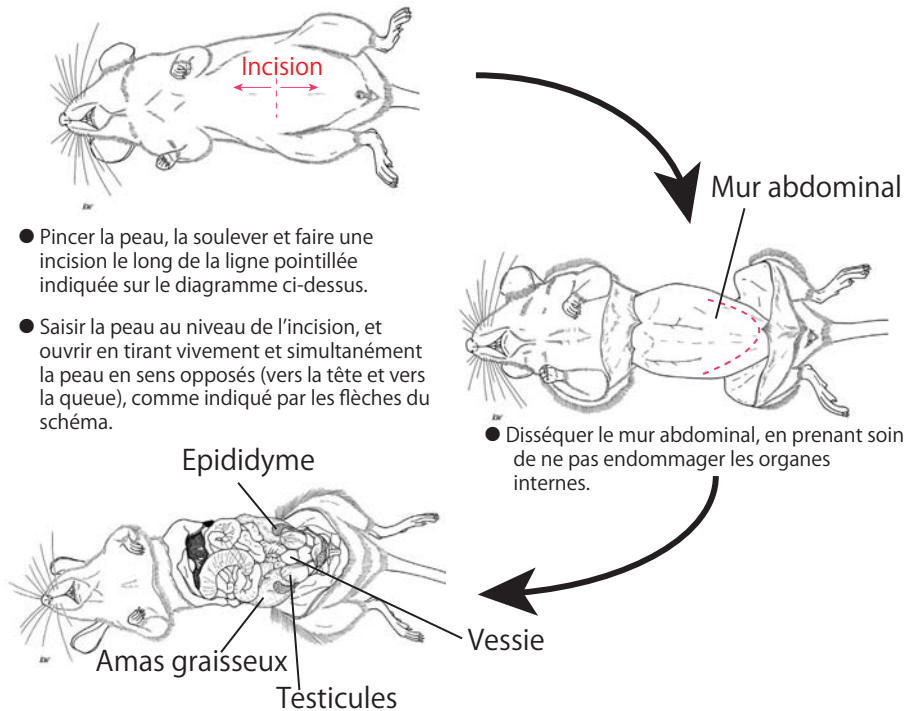


Note

Il y a trois méthodes différentes pour préparer le CARD MEDIUM®, selon que la fécondation *in vitro* est faite à partir de sperme frais, congelé, ou réfrigéré. Reportez-vous au manuel d'instruction du CARD MEDIUM® pour plus de détails.

Collection de spermatozoïdes

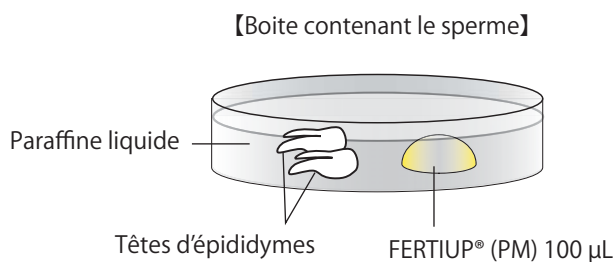
1. Sacrifier un ou deux males matures (âgés de 3 à 6 mois) et disséquer leurs queues d'épididymes en évitant au maximum de prélever graisse, sang ou autres fluides.
2. Placer l'échantillon sur du papier filtre pour se débarrasser de fluides potentiels.



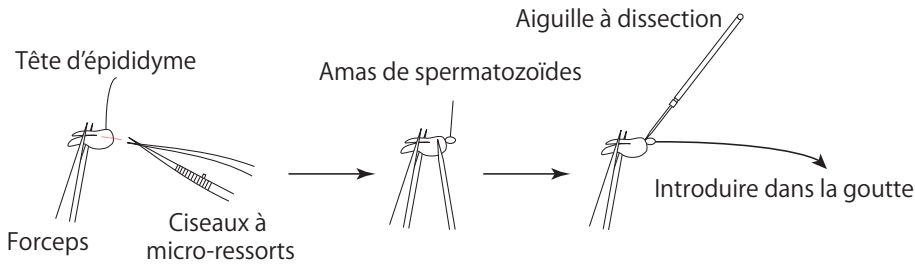
[Prélever les têtes d'épididymes] No. 02-01



3. Placer les queues d'épididymes dans la goutte de FERTIUP® (PM) (boîte contenant le sperme).



4. Disséquer le canal de chaque queue d'épididyme avec les ciseaux à micro-ressorts, puis presser doucement sur la surface des queues d'épididymes avec l'aiguille de dissection pour faire sortir le sperme.
5. Avec l'aiguille de dissection, introduire les amas de spermatozoïdes (expulsés des queues d'épididymes) dans la goutte de FERTIUP® (PM).

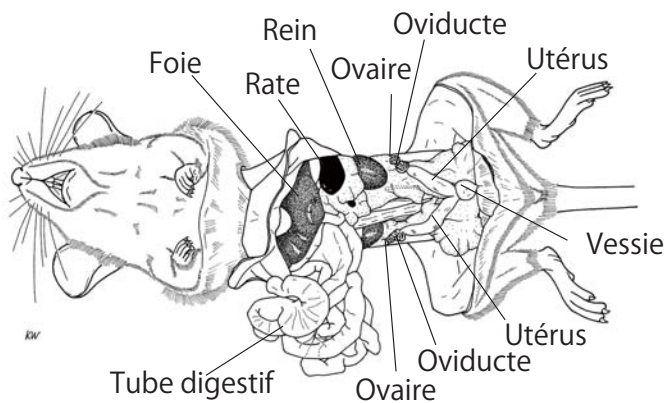


[Expulser les spermatozoïdes] No.02-02

- Placer la suspension dans l'étuve (37 °C, 5% CO₂) pendant 60 minutes pour permettre au sperme de féconder les ovocytes avant insémination.

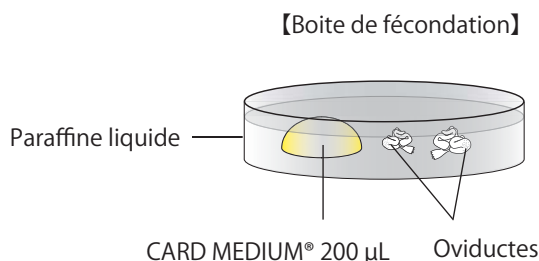
Collection des Ovocytes

- Sacrifiez une femelle superovulée mature (âgée de 8 à 12 semaines) approximativement 15-17 heures après administration de Gonadotrophine humaine (hCG).
- Disséquez la souris pour exposer la cavité abdominale.
- Poussez l'appareil digestif sur le côté pour exposer les utérus, oviductes, et ovaires.
- Prélevez les utérus, oviductes, et ovaires et placez-les sur le papier filtre stérile.
- Disséquez les oviductes, en se débarrassant au maximum des graisses, sang, et autres fluides.



[Prélever les oviductes] No.02-03

- Immergez les oviductes dans la paraffine liquide de la boîte de fécondation.



Note

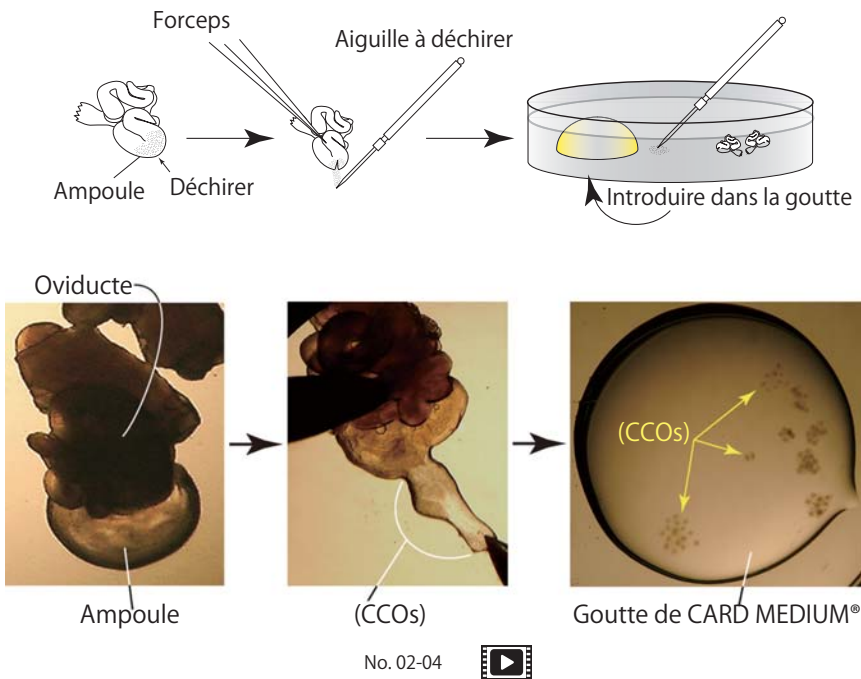
Le degré de fertilité varie énormément selon le type de spermatozoïdes utilisés.

Les spermatozoïdes les plus fertiles peuvent être observés à la périphérie de la goutte de milieu de culture, après avoir procédé à des mouvements de rotation de la boîte de Pétri.

A contrario, les spermatozoïdes les moins fertiles sont peu mobiles et non homogènes.

- Maintenez chaque oviducte en position fixe au fond de la boîte de Pétri avec un forceps, et déchirez l'ampoule avec l'aiguille de dissection pour faire sortir les complexes cumulus-ovocytes (CCOs). Déplacez les CCOs dans la goutte de CARD MEDIUM® (200 µL).

[Introduire les Complexes Cumulus-Ovocytes (CCOs) dans une goutte de CARD MEDIUM®]



Note

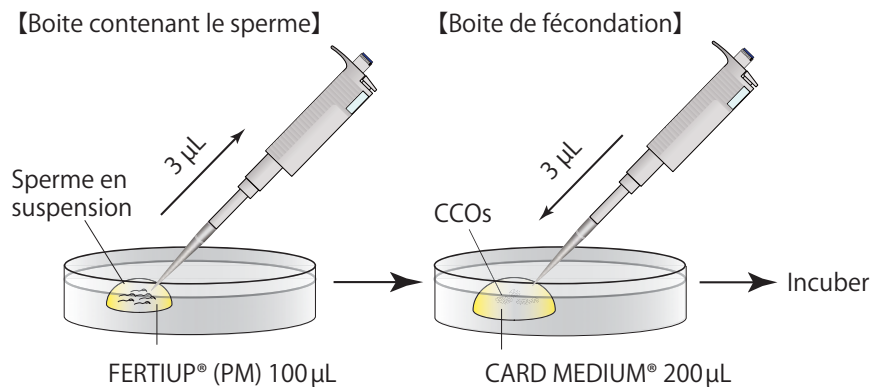
Assurez-vous d'effectuer toutes les opérations, depuis l'abatage des femelles et la collecte des oviductes jusqu'à l'immersion des CCOs dans la goutte de CARD MEDIUM® en un minimum de temps (30 secondes maximum).

Si vous effectuez la procédure sans assistance, assurez-vous de ne pas sacrifier plusieurs souris à la fois. Il est préférable de n'abattre qu'une souris et prélever ses oviductes rapidement avant de procéder à la dissection de la souris suivante.

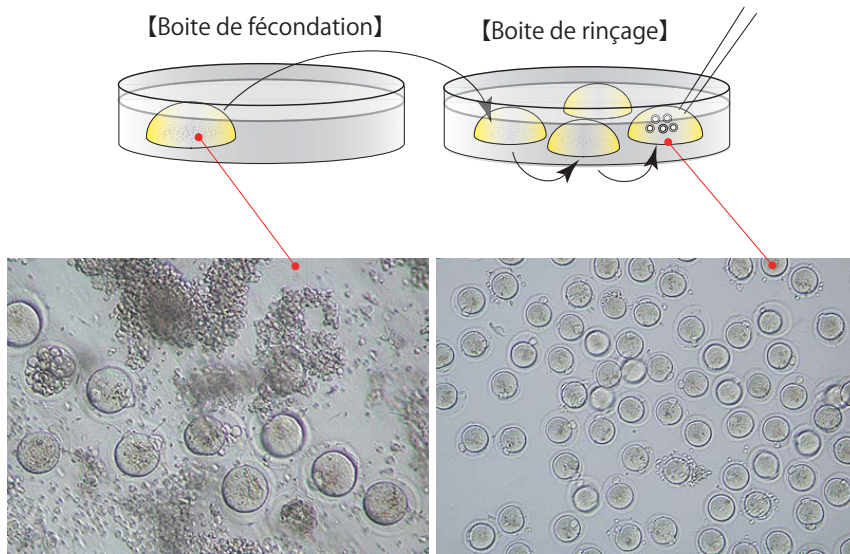
- Maintenez la boîte de fécondation avec les CCOs dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) pendant 30-60 minutes avant insémination.

Insémination

- Pipetez (embouts de pipettes Cat. No.114; Quality Scientific Plastics) un volume approprié (en général 3 µL) de sperme en suspension dans la goutte de CARD MEDIUM® contenant les CCOs.
- Placez la boîte de fécondation dans l'étuve (37°C, 5% CO₂).



3. 3 heures après insémination, rincez les ovocytes 3 fois dans du mHTF frais (80 μ L) de la boîte de rinçage, en évitant de transférer du CARD MEDIUM®.

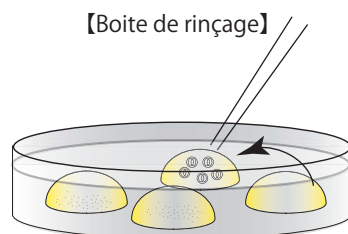


4. 6 heures après insémination, observez les ovocytes dans la 3ème goutte de mHTF et éliminez tout ovocyte parthénogénétique (n'ayant qu'un seul pronucléus).

[Apparence des ovocytes fécondés, non-fécondés, ou parthénogénétiques]



5. Après une nuit de culture, transférez uniquement les embryons ayant atteint le stade 2 cellules dans la 4ème goutte de mHTF de la boîte de rinçage. Ces embryons peuvent être vitrifiés, réimplantés, ou cultivés jusqu'au stade blastocyste. (Reportez-vous aux chapitres Vitrification rapide d'embryons murins en page 54 et Réimplantation d'embryons dans l'oviducte en page 66).



Références

1. Toyoda Y., Yokoyama M., and Hosi T. 1971. Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 16: 147-151.

Note

Lors de cette étape, il est important de repérer les ovocytes parthénogénétiques et des les éliminer. Si cette étape est occultée, les ovocytes parthénogénétiques auront atteint le stade deux-cellules dès le lendemain, et il sera alors impossible de les distinguer des ovocytes fécondés.

Note

Un ovocyte fécondé a deux pronucléi, un male et un femelle (A). Au contraire, un ovocyte parthénogénétique n'a qu'un pronucléus (B) et un ovocyte non fécondé n'a pas de pronucléus (C).

1-3 Fécondation *In Vitro* (FIV) après ultra-superovulation

Matériel and Equipement

1. Agent d'Ultra-superovulation (CARD HyperOva®)
2. Le reste du matériel est similaire à celui utilisé pour la FIV avec sérum de jument (PMSG). Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 6.

Procédure

Ultra-superovulation

1. Induire la superovulation par injection intrapéritonéale de 0.1 à 0.2mL de CARD HyperOva® sur une femelle âgée de 26 à 30 jours (le jour de naissance est compté comme Jour 0).
2. 48 heures plus tard, procéder à une injection intrapéritonéale de 7.5UI de gonadotrophine humaine (hCG).

Préparation des boîtes de Pétri et collection de spermatozoïdes

1. Préparer les boîtes de Pétri et collecter les spermatozoïdes de manière similaire à celle de la FIV avec sérum de jument (PMSG). Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 6.

Collection des ovocytes

Après injection de CARD HyperOva®, les oviductes des femelles superovulées enflent de manière significative. Prenez donc soin de les manipuler avec précaution en suivant la méthode décrite ci-dessous pour ne pas les endommager.

1. Retirer les oviductes (avec ampoules) de la cavité abdominale des femelles.
2. Placer les oviductes rapidement sur du papier filtre stérile pour éliminer l'excès de sang et fluides.
3. Immerger les oviductes dans la paraffine liquide de la boîte de fécondation.
4. Utiliser une goutte de CARD MEDIUM® (200 µL) par femelle (2 oviductes).

Procéder aux étapes suivantes comme indiqué au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 9.

Insémination

1. Pour l'insémination, pipeter 6 µL de sperme en suspension (pré-incubé de manière identique à la FIV avec sérum de jument – PMSG).

Les autres procédures relatives à l'insémination sont décrites au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 10.

Références

1. Takeo T., Nakagata N. 2015. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice. *PLoS ONE* 10(5): e0128330. doi:10.1371/journal.pone.0128330
2. Takeo T., Nakagata N. 2016. Immunotherapy using inhibin antiserum enhanced the efficacy of equine chorionic gonadotropin on superovulation in major inbred and outbred mice strains. *Theriogenol.* doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.076

2-1 Collection et transport réfrigéré de têtes d'épididymes

Matériel and Equipement

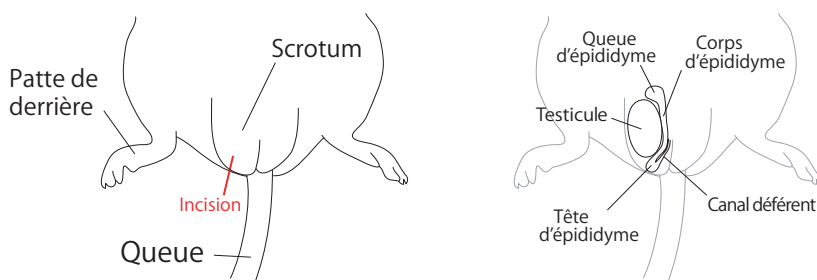
1. Souris male (âgée de 12 semaines)
2. Anesthésiants
3. Plaque chauffante (37°C)
4. Ciseaux de précision
5. Une paire de forceps watchmaker's #5
6. Clips de suture (Autoclip 9 mm; Clay Adams 427631) et applicateur de clips (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams 427630)
7. Moniteur de température (Thermochron iButton Cat. No. DS1921G; Maxim Integrated Products)
8. Solution pour transport réfrigéré de têtes d'épididymes (Cat. No. KYD-007-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
9. Kit de transport réfrigéré CARD (Cat. No. KYD-006-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
 - Thermos (Cat. No. JMK-501; Thermos K.K.)
 - Boîte en papier (pouvant contenir des tubes de 0.2mL)
 - Un morceau de coton
 - Blocs réfrigérants (petits et grands)
 - Conteneur de transport en Polystyrène (Cat. No. KC-3, KARUX)

Le kit de transport CARD et la solution de préservation doivent tous les deux être réfrigérés à 4-8°C avant utilisation.

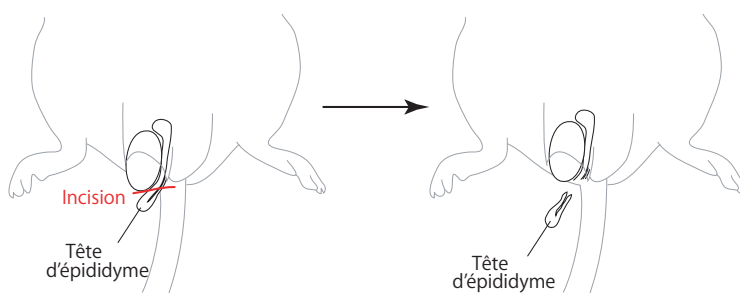
Procédure

Collection des têtes d'épididymes

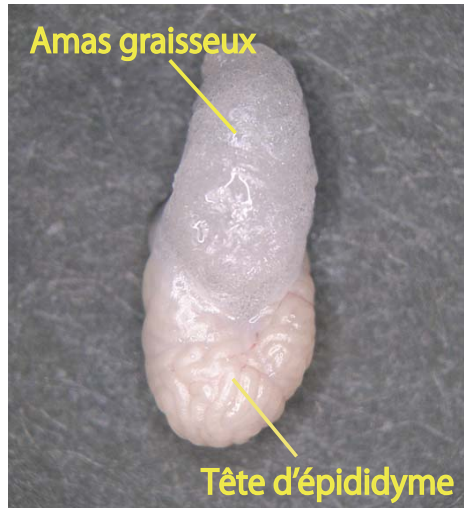
1. Anesthésier la souris male.
2. Faire une petite incision au niveau du scrotum pour faire sortir la tête d'épididyme.



3. Couper le canal déférent et le corps de l'épididyme, puis collecter la tête d'épididyme.



[Collecte de tête d'épididyme]



[Collection de la tête d'épididyme sur un male anesthésié] No.03-01

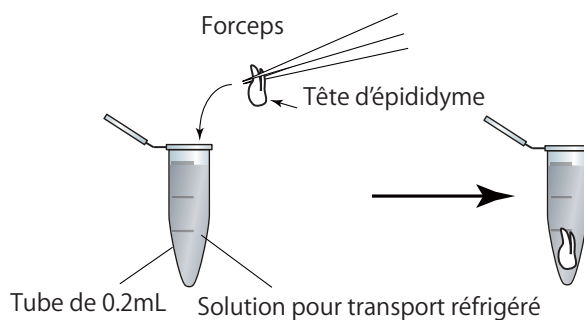


4. Replacer les testicules dans l'abdomen et suturer à l'aide de clips.
5. Maintenir la souris sur la plaque chauffante à 37°C jusqu'à ce que l'effet des anesthésiants ait complètement disparu.

Emballage et transport des têtes d'épididymes

Le matériel utilisé pour emballer les têtes d'épididymes doit être maintenu à 4-8 °C jusqu'à utilisation. De plus, la procédure d'emballage doit être effectuée le plus rapidement possible pour éviter le réchauffement des têtes d'épididymes.

1. Transférez les têtes d'épididymes dans le tube de 0.2mL contenant la solution de transport.



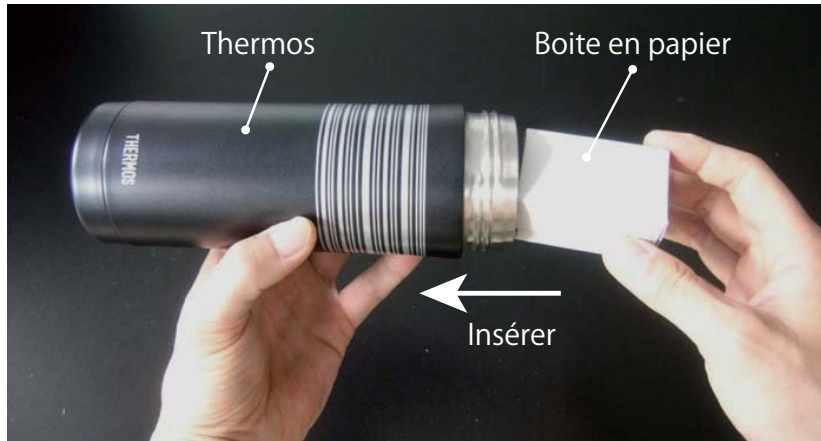
2. Placez le tube contenant les têtes d'épididymes, le moniteur de température, et le morceau de coton dans la boîte en papier.



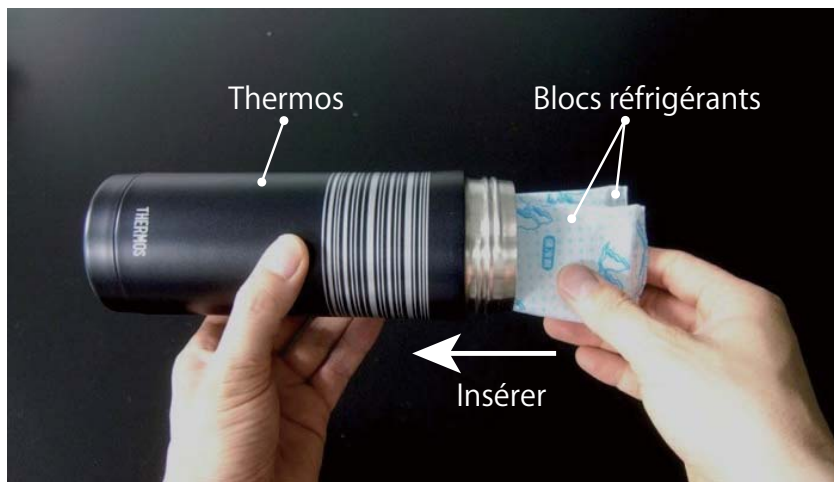
Remarque

Une semaine après l'opération chirurgicale le male peut être à nouveau accouplé.

3. Placez la boîte en papier dans le thermos.



4. Placer deux petits blocs réfrigérants dans le thermos.



5. Visser le couvercle du thermos.



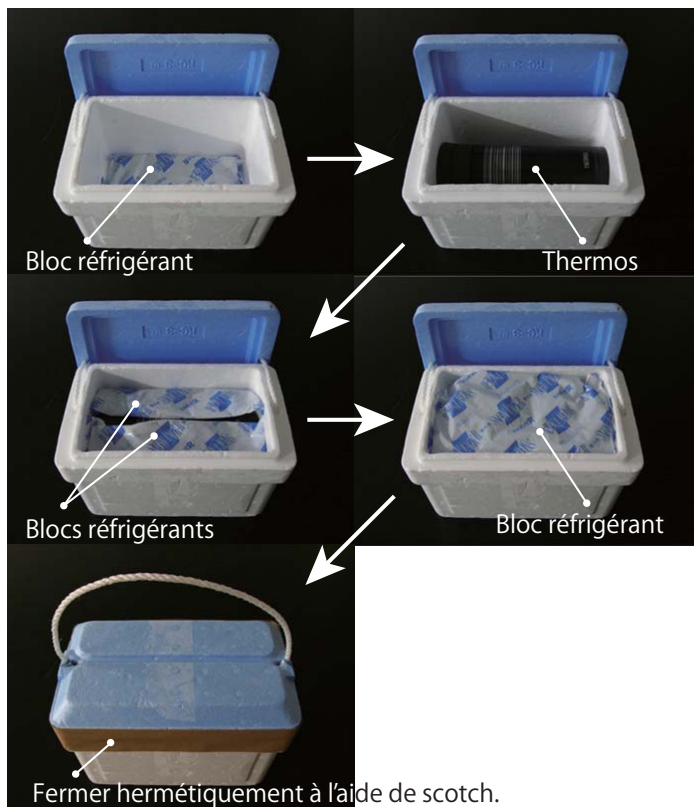
6. Mettre un grand bloc réfrigérant au fond du conteneur en polystyrène et placer le thermos par dessus.
 7. Ajouter un grand bloc réfrigérant de chaque côté du thermos, et un dernier par dessus.
 8. Mettre le couvercle du conteneur en place et attacher le avec du scotch.

Note

Prenez soin de ne pas placer la boîte en papier à l'envers.

Note

Il n'est pas possible de mettre le thermos au fond du conteneur car la taille du thermos est la même que celle du conteneur. Le thermos doit donc être placé au centre du conteneur en polystyrène, ce qui assure une plus grande protection durant le transport.



9. Maintenir le conteneur réfrigéré jusqu'à arrivée du transporteur.
10. Envoyer le conteneur par service postal.

Références

1. Takeo T., Tsutsumi A., Omaru T., Fukumoto K., Haruguchi Y., Kondo T., Nakamuta Y., Takeshita Y., Matsunaga H., Tsuchiyama S., Sakoh K., Nakao S., Yoshimoto H., Shimizu N., and Nakagata N. 2012. Establishment of a transport system for mouse epididymal sperm at refrigerated temperatures. *Cryobiology*. 65(3): 163-168.

Note

Le conteneur doit être maintenu réfrigéré durant le transport. Assurez-vous des conditions de transport auprès du service postal.

Remarque

Les capacités de fertilisation du sperme épидидymaire réfrigéré restent maximales jusqu'à 72 heures.

2-2 Fécondation *In Vitro* avec sperme épидидymaire transporté à basse température

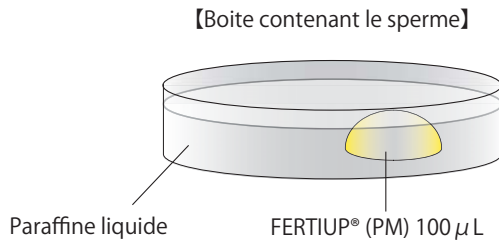
Matériel et Equipement

1. Queues d'épididymes transportées à basse température
2. FERTIUP® (Milieu de Préincubation: PM, Cat. No. KYD-002-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
3. mHTF (Fluide tubal humain modifié)
4. Paraffine liquide
5. Micropipettes
6. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
7. Ciseaux de précision
8. Une paire de forceps watchmaker's #5
9. Papier filtre
10. Etuve humidifiée (37°C , 5% CO₂)

Procédure

Collection des queues d'épididymes

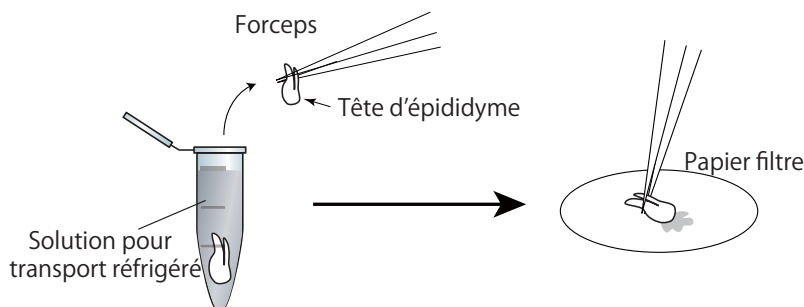
1. Pipetez une goutte (100 µL / goutte) de FERTIUP®(PM) dans une boîte de Pétri and recouvrez-la avec de la paraffine liquide 30 minutes avant de collecter le sperme épидидymaire transporté à basse température, et placer la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO₂)



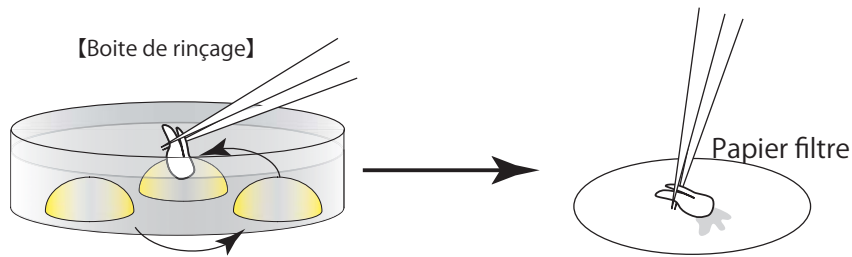
2. Retirez le tube de 0.2mL du conteneur de transport en polystyrène.

[Collecter les queues d'épididymes] No. 04-01 

3. Ouvrez le tube, collectez les queues d'épididymes et placez-les sur un papier filtre rapidement pour égoutter la solution de transport.



4. Rincez les queues d'épididymes dans chacune des trois gouttes de mHTF de la boîte de rinçage. Après rinçage, égouttez l'excès de mHTF sur le papier filtre.



5. Placez les queues d'épididymes dans la boîte de Pétri contenant le sperme. Les spermatozoïdes épидидymaires transportés à basse température peuvent être utilisés pour la fécondation *in vitro* de la même manière que le sperme fraîchement prélevé. Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 6.

Références

1. Takeo T., Tsutsumi A., Omaru T., Fukumoto K., Haruguchi Y., Kondo T., Nakamuta Y., Takeshita Y., Matsunaga H., Tsuchiyama S., Sakoh K., Nakao S., Yoshimoto H., Shimizu N., and Nakagata N. 2012. Establishment of a transport system for mouse epididymal sperm at refrigerated temperatures. *Cryobiology*. 65(3): 163-168.

Remarque

Préparer les boîtes de rinçage juste avant leur utilisation en disposant 3 gouttes de mHTF (100 μ L / goutte) dans une boîte de Pétri sans recouvrir de paraffine liquide.

Note

Si le sperme ne sort que difficilement, procédez à une incision supplémentaire dans les queues d'épididymes pour libérer plus de sperme.

Note

Il y a trois méthodes différentes pour préparer le CARD MEDIUM®, selon que la fécondation *in vitro* est faite à partir de sperme frais, congelé, ou réfrigéré. Reportez-vous au manuel d'instruction du CARD MEDIUM® pour plus de détails.

3-1 Cryopréservation de spermatozoïdes murins

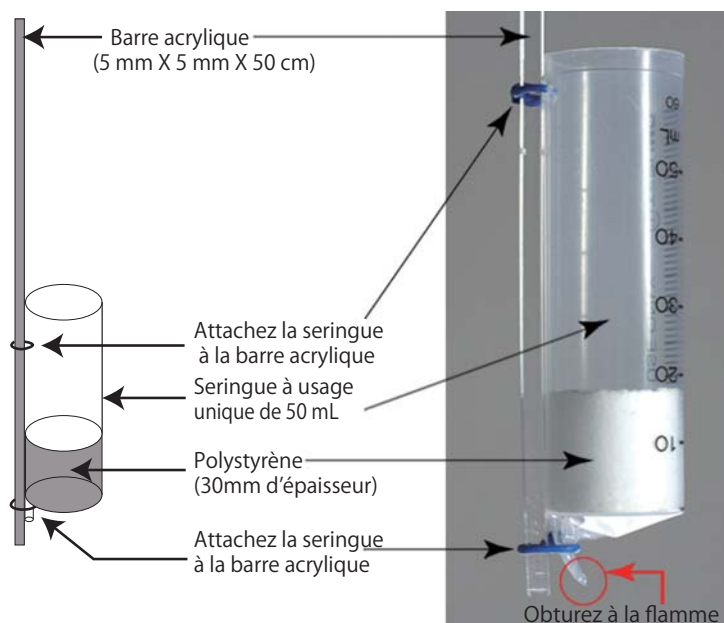
Matériel and Equipement

1. Souris male (âgée de 12 semaines)
2. Ciseaux à micro-ressorts (lame de 5 mm)
3. Une paire de forceps watchmaker's #5
4. FERTIUP® (Agent CryoProtecteur: ACP, Cat. No. KYD-001-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
5. mHTF (Fluide tubal humain modifié)
6. Paraffine liquide
7. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
8. Embouts pour pipettes
9. Paillettes pour sperme (10 Pièces x 10 lots, EOG stérilisées, Cat. No. KYD-S020X10, Cosmo Bio Co., Ltd.)
10. Micropipettes
11. Connecteur de paillettes (Cat. No. KYD-S025, Cosmo Bio Co., Ltd.)
12. Scelleuse thermique à impulsions
13. Gobelet pour la congélation (Cat. No. KYD-S018, Cosmo Bio Co., Ltd.)
14. Cassette triangulaire (10 unités, Cat. No. KYD-S021 or KYD-S035, Cosmo Bio Co., Ltd.)
15. Cuve ou conteneur à azote liquide
16. Plaque chauffante (37°C)

Procédure

Préparation du gobelet pour la congélation

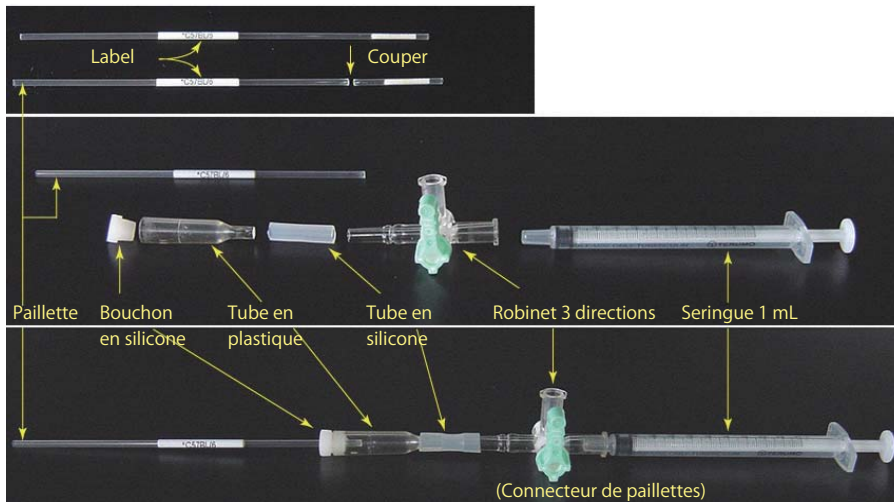
1. Insérer fermement un morceau de polystyrène au fond de la seringue.
2. Obturez le bout de la seringue en le faisant fondre dans une flamme.
3. Attachez la seringue à une barre en acrylique.



Préparation du connecteur de paillettes

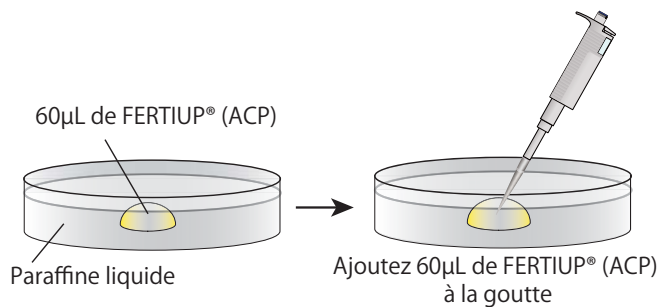
1. Assemblez une seringue 1 mL, un robinet 3 directions, un tube en silicone, un embout en plastique, et un bouchon de silicone comme indiqué sur le schéma ci-dessous.
2. Pour utiliser le connecteur de paillettes, il suffit de couper la paillette pour se débarrasser du bouchon en coton, puis enfiler la paillette dans le bouchon de silicone.

1. [Assemblage du connecteur de paillettes]

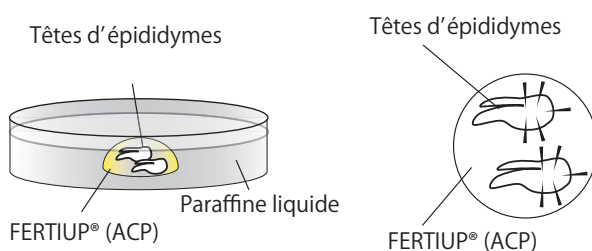


Préparation de la suspension de sperme

1. Pipeter une goutte de 60 μL de FERTIUP® (ACP) sur une boîte de Pétri de 35 mm et recouvrez-la de paraffine liquide.
2. Ajouter 60 μL de la même solution à la première goutte (volume final: 120 μL) pour créer une goutte semi-sphérique et minimiser le diamètre de la base. Placer la boîte sur une plaque chauffante à 37°C jusqu'à utilisation.



3. Sacrifiez un male (>12 semaines) par dislocation cervicale et disséquez les deux têtes d'épididymes de manière aseptique.
4. Placez les têtes d'épididymes sur le papier filtre pour égoutter au microscope le sang et la graisse.
5. Transférez les têtes d'épididymes dans une goutte de FERTIUP® (ACP) et faites 5 à 6 incisions dans les épидидymes à l'aide des forceps watchmaker's #5 et des ciseaux à micro-ressorts.

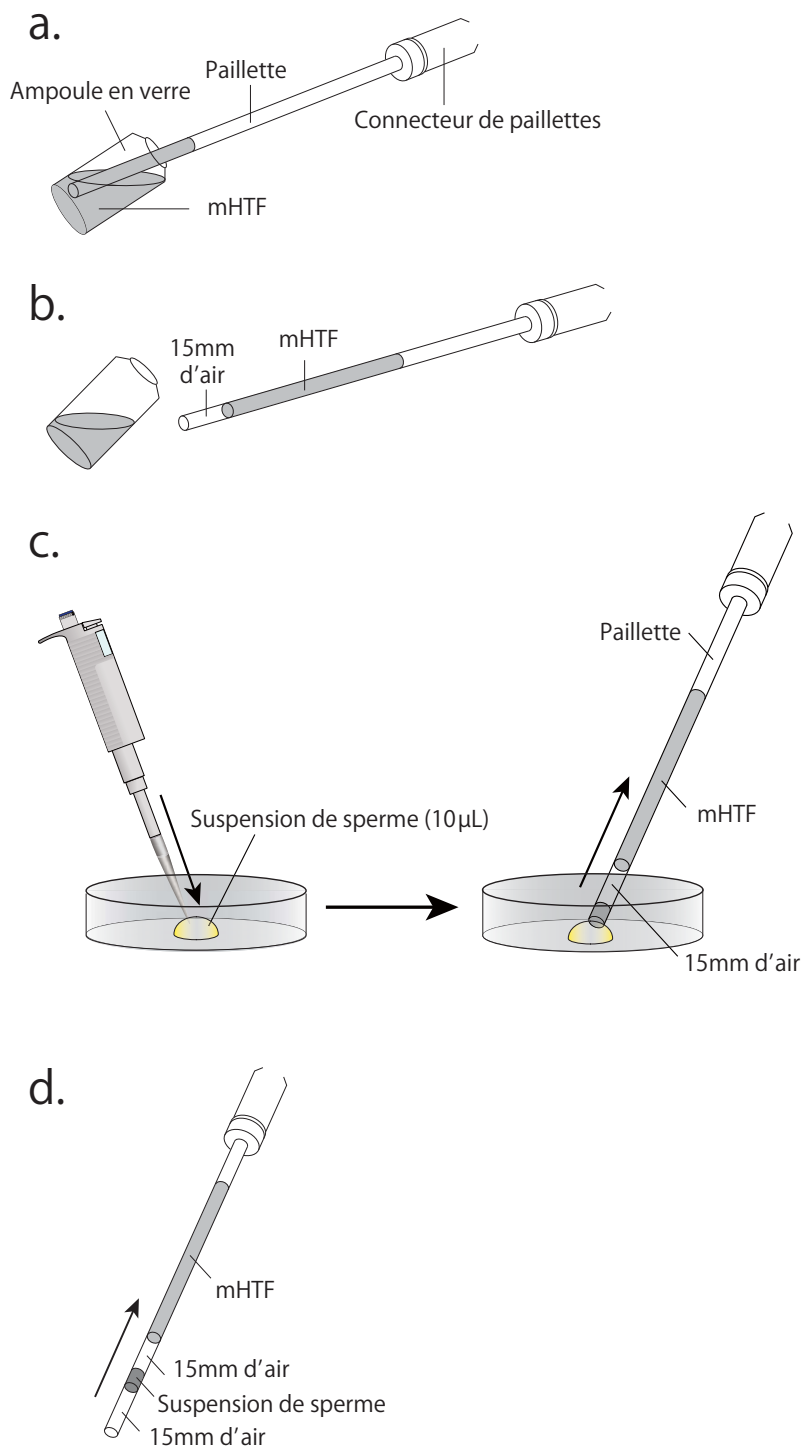


6. Placer la boîte sur la plaque chauffante à 37°C pendant 3 minutes et faites faire de petites rotations à la boîte pour disperser le sperme dans le FERTIUP® (ACP) chaque minute.

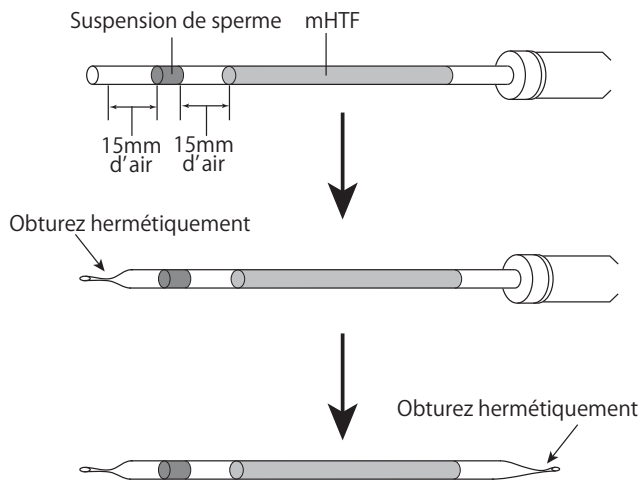
[Dissection des têtes d'épididymes et préparation de la suspension de sperme] No. 05-01 

Préparer les paillettes contenant le sperme en suspension

1. Attachez une paillette au connecteur.
2. Aspirer délicatement dans la paillette et dans l'ordre suivant:
 - a. 100 μ L de mHTF,
 - b. 15mm d'air,
 - c. 10 μ L de sperme en suspension,
 - d. 15 mm d'air.



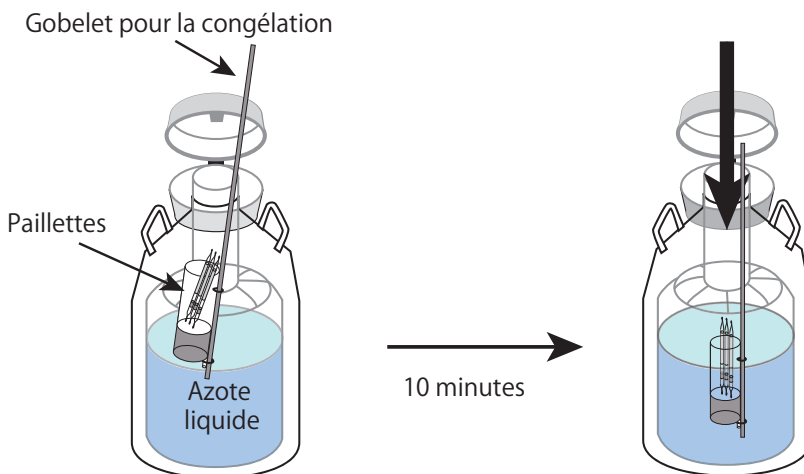
3. Scellez les deux côtés de la paillette avec la scelleuse à impulsions.



4. Répétez la procédure pour collecter 10 échantillons par souris de la même manière.

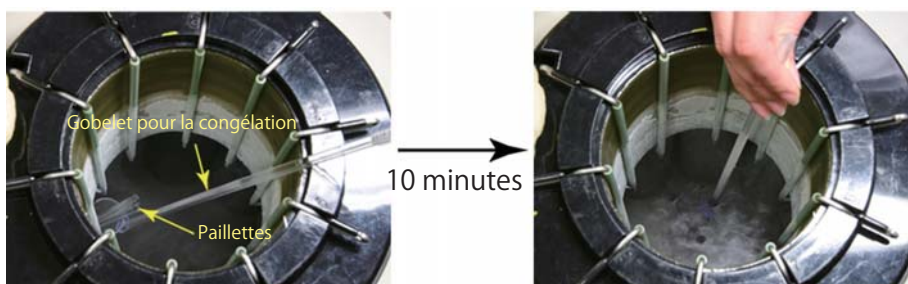
Congélation de sperme dans une cuve cryobiologique

1. Placez les paillettes dans un gobelet pour congélation, et laissez-le flotter dans le conteneur cryobiologique.
2. Au bout de 10 minutes, immergez rapidement le gobelet dans l'azote liquide.



[Gobelet flottant sur l'azote liquide]

[Gobelet immergé dans l'azote liquide]

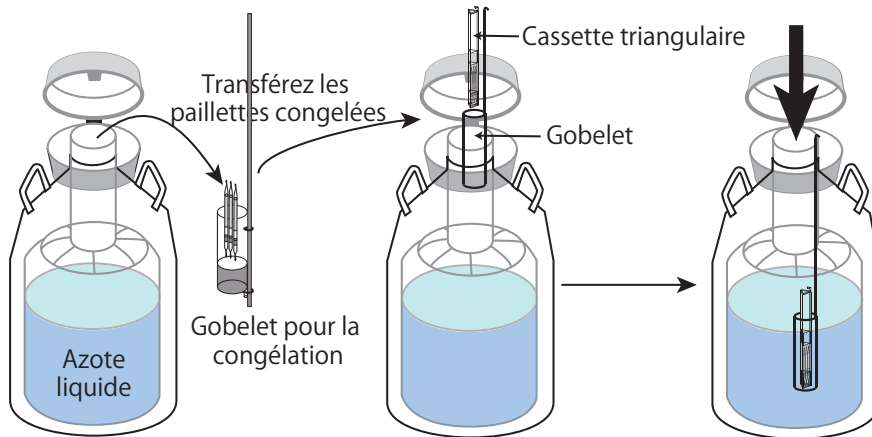


[Congélation des paillettes] No. 05-02

Remarque

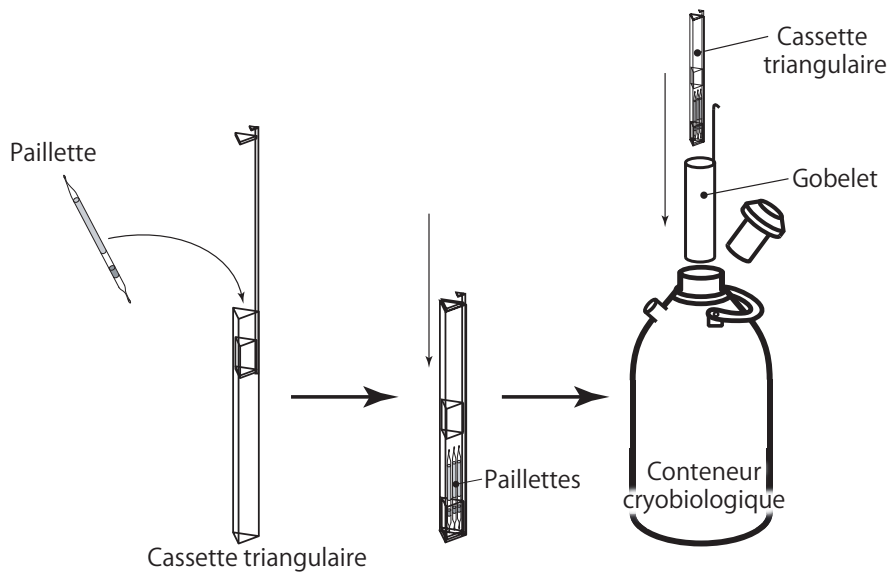
Le mHTF est ajouté dans la paillette pour éviter que celle-ci flotte à la surface de l'azote liquide car le mHTF augmente le poids de la paillette, lui permettant de couler.

- Retirez le gobelet de l'azote liquide et transférez les paillettes dans une cassette triangulaire pour un stockage à long terme dans une cuve à azote liquide.



Congélation de sperme dans un conteneur cryobiologique

- Transférez les paillettes dans une cassette triangulaire.
- Placez la cassette triangulaire dans un gobelet pré-refrigéré.
- Placez le gobelet dans le conteneur à azote liquide pendant 10 minutes.



Remarque

La congélation de sperme dans un conteneur cryobiologique peut être utilisée à des fins de transport du sperme.

Références

1. Nakagata N., and Takeshima T. 1992. High fertilizing ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. *Theriogenol.* **37**: 1283-1291.
2. Nakagata N., Ueda S., Yamanouchi K., Okamoto K., Matsuda Y., Tsuchiya T., Nishimura M., Oda S., Koyasu K., Azuma S., and Toyoda Y. 1995. Cryopreservation of wild mouse spermatozoa. *Theriogenol.* **43**: 635-643.
3. Nakagata N. 1996. Use of cryopreservation techniques of embryos and spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice and for maintenance of Tg mouse lines. *Lab. Anim. Sci.* **46**: 236-238.
4. Okamoto M., Nakagata N., Ueda O., Kamada N., and Suzuki H. 1998. Cryopreservation of gene disrupted mouse spermatozoa. *J. Mamm. Ova. Res.* **15**: 77-80.
5. Takeo T., Hoshii T., Kondo Y., Toyodome H., Arima H., Yamamura K.I., Irie T., and Nakagata N. 2008. Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. *Biol Reprod.* **78**(3): 546-551.
6. Nakagawa Y., Fukumoto K., Kondo T., Koga M., Takeshita Y., Nakamura Y., Sakaguchi M., Haruguchi Y., Tsuchiyama S., Kaneko T., and Nakagata N. 2009. Fertilization ability of C57BL/6J mouse spermatozoa frozen in a dry shipper. *Exp. Anim.* **58**(3) Suppl: 297.
7. Takeo T., and Nakagata N. 2010. Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Lab. Anim.* **44**(2): 132-137.
8. Nakagata N. 2011. Cryopreservation of mouse spermatozoa and *in vitro* fertilization. *Methods Mol Biol.* **693**: 57-73.
9. Takeo T., Nakagata N. 2011. Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL /6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin. *Biol Reprod.* **85**(5): 1066-1072.

3-2 Fécondation *In Vitro* avec spermatozoïdes congelés

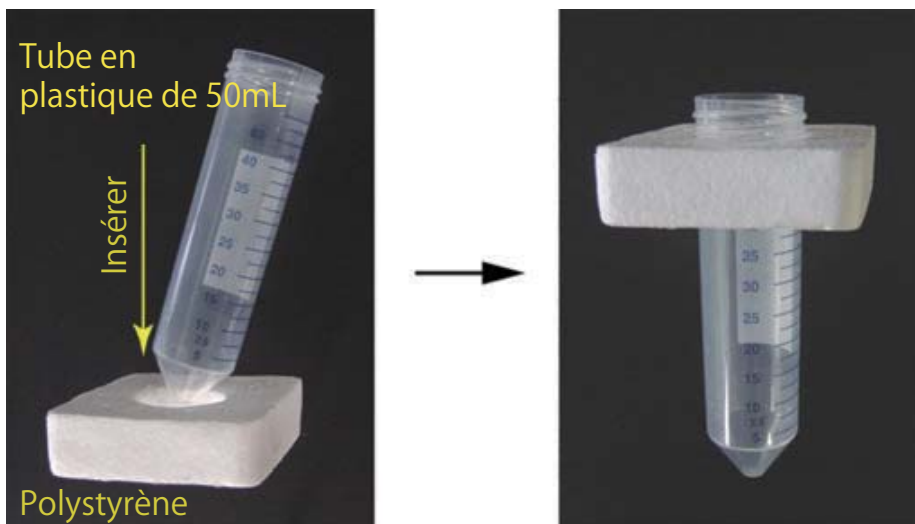
Matériel and Equipement

1. Souris femelle superovulée avec PMSG et hCG
2. FERTIUP® (Milieu de Préincubation: PM, Cat. No. KYD-002-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
3. CARD MEDIUM® (Cat. No. KYD-003-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
4. mHTF (Fluide tubal humain modifié)
5. Paraffine liquide
6. Embouts pour pipette (Cat. No. 3520; Thermo SCIENTIFIC)
7. Boîtes de Pétri en plastique (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
8. Connecteur de paillettes (Cat. No. KYD-S025, Cosmo Bio Co., Ltd.) (Se référer au chapitre Congélation de spermatozoïdes murins en page 21)
9. Bain-marie maintenu à 37°C
10. Morceau de polystyrène pour la décongélation
11. Micropipettes
12. Etuve humidifiée (37°C, 5% CO₂)

Procédure

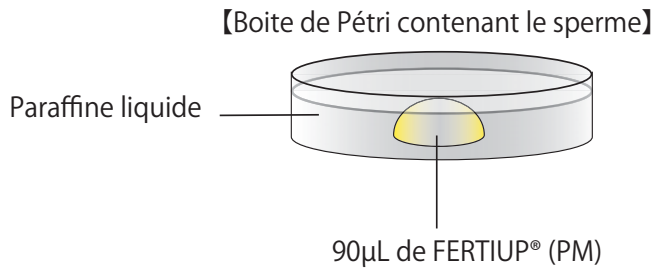
Préparation du polystyrène pour la décongélation

1. Découpez un morceau de polystyrène capable de faire flotter un tube de 50 mL, comme indiqué sur le schéma ci-dessous.

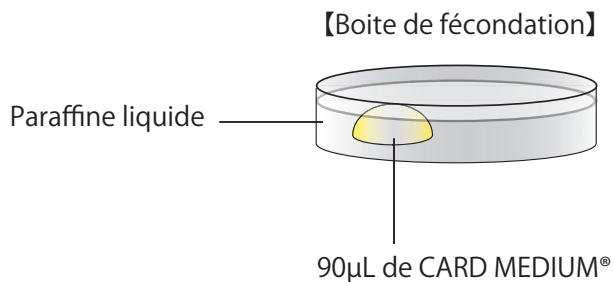


Préparation pour la décongélation

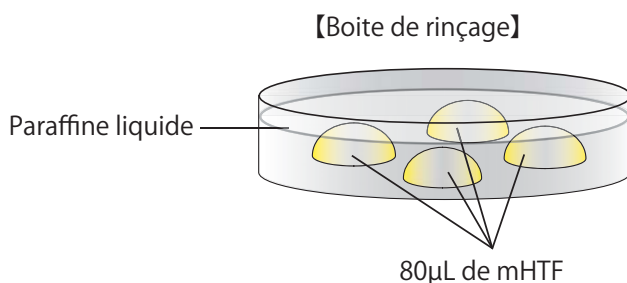
1. Maintenez le bain-marie à 37°C .
2. Versez de l'eau (37°C) dans le tube de 50 mL puis insérez-le dans le morceau de polystyrène avant de laissez flotter le tout dans le bain-marie.
3. Mettre une goutte (90 μ L / goutte) de FERTIUP® (PM) dans une boîte de Pétri et recouvrez-la de paraffine liquide 30 minutes avant de commencer la décongélation. Placez la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂).



4. Mettre une goutte (90 μ L / goutte) de CARD MEDIUM® dans une boîte de Pétri et recouvrez-la de paraffine liquide 10 minutes avant de collecter les ovocytes. Placez la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂).



5. Mettre quatre gouttes (80 μ L / goutte) de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrez-les de paraffine liquide. Placez la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) au minimum 30 minutes.

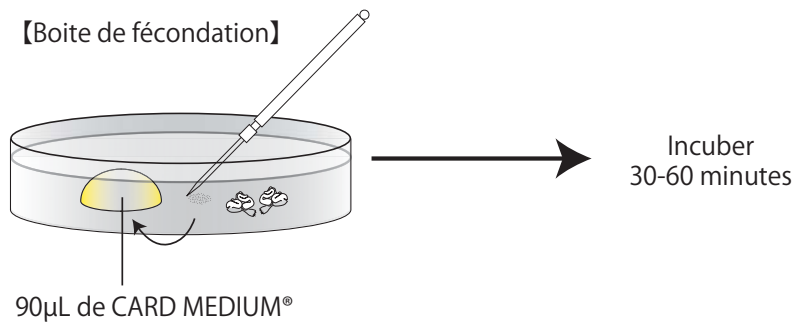


Note

Il y a trois méthodes différentes pour préparer le CARD MEDIUM®, selon que la fécondation *in vitro* est faite à partir de sperme frais, congelé, ou réfrigéré. Reportez-vous au manuel d'instruction du CARD MEDIUM® pour plus de détails.

Collection des Ovocytes

1. Sacrifiez une femelle 15-17 heures après injection d'hCG et disséquer les oviductes. (Se référer au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 9)
2. Collectez les complexes cumulus-ovocytes (CCOs) à l'aide d'aiguilles de dissection pointues et placez 4-6 CCOs par goutte de CARD MEDIUM® (90 µL) (Boîte de Fécondation).
3. Maintenez la boîte de fécondation avec les CCOs dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) pendant 30-60 minutes avant insémination.



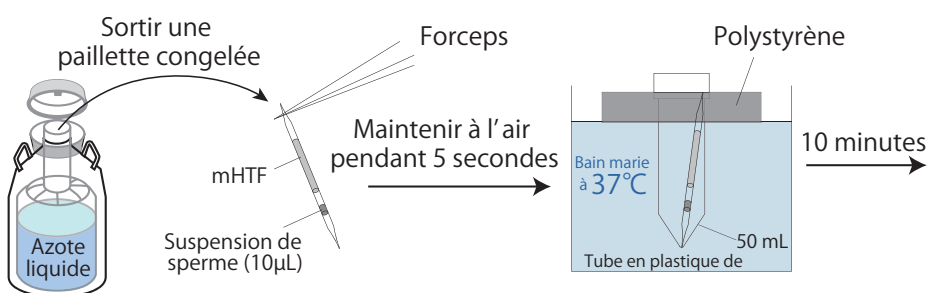
Note

Assurez-vous d'effectuer toutes les opérations, depuis l'abatage des femelles et la collecte des oviductes jusqu'à l'immersion des CCOs dans la goutte de CARD MEDIUM® en un minimum de temps (30 secondes maximum).

Si vous effectuez la procédure sans assistance, assurez-vous de ne pas sacrifier plusieurs souris à la fois. Il est préférable de n'abattre qu'une souris et prélever ses oviductes rapidement avant de procéder à la dissection de la souris suivante.

Décongélation de spermatozoïdes murins

1. Sortez une paille de l'azote liquide et maintenez-la à l'air ambiant pendant 5 secondes.
2. Placez immédiatement la paille dans le tube de 50 mL flottant dans le bain-marie à 37°C pendant 10 minutes.
3. Dix minutes après immersion, retirez la paille du bain-marie.
4. Essayez la paille avec du papier filtre.



Note

Assurez-vous d'immerger complètement la partie de la paille contenant le sperme lors de la décongélation dans le bain-marie.

Les spermatozoïdes ayant été congelés puis réanimés sont particulièrement sensibles aux changements environnementaux.

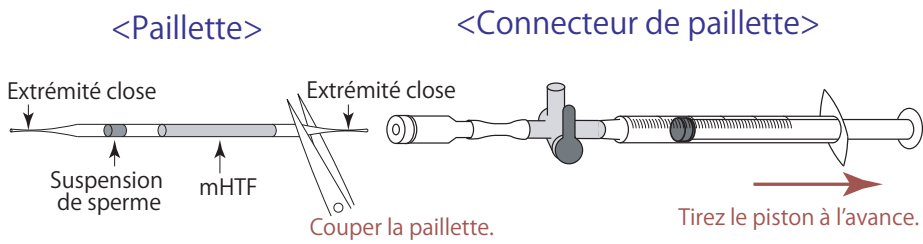
Si la paille n'est pas maintenue dans le bain-marie assez longtemps (10 minutes) la motilité des spermatozoïdes décongelés sera réduite.

[Décongélation de Spermatozoïdes murins] No. 06-01

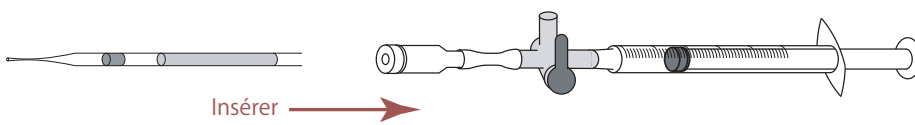


Transfert et préincubation de la suspension de sperme décongelée

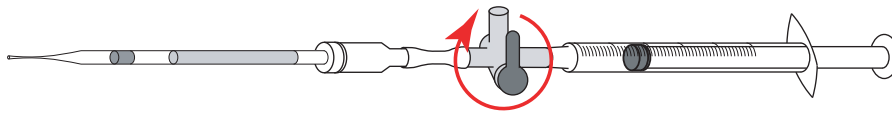
1. Tirez légèrement le piston hors de la seringue du connecteur de paillettes, et coupez la paillette aux ciseaux entre le mHTF et l'extrémité de la paillette.



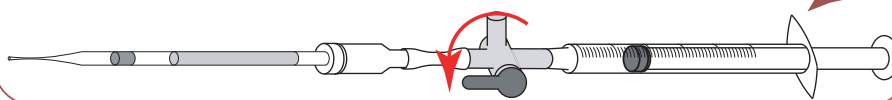
2. Insérez la paillette dans le connecteur.



3. Ouvrir le robinet afin de relâcher la pression créée par l'insertion de la paillette dans le connecteur.

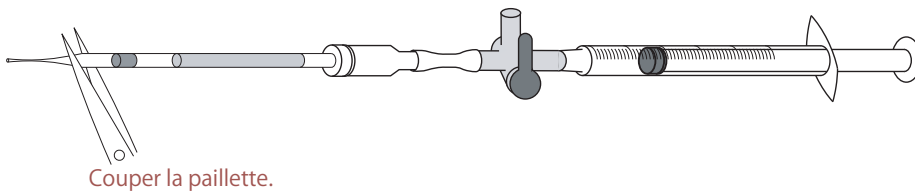


Si vous avez omis de tirer le piston à l'avance, vous pouvez le faire après avoir ouvert le robinet (en le tournant vers l'avant).

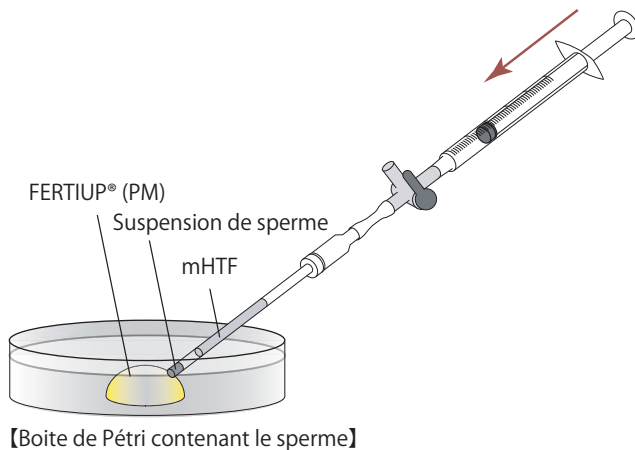


4. Refermez le robinet et coupez la paillette entre l'extrémité et la suspension de sperme.

Refermez le robinet en le mettant en position verticale.



- Poussez le piston avec précaution afin de ne transférer que la suspension de sperme dans la goutte de FERTIUP®(PM) (boîte de Pétri contenant le sperme), puis placez la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) pendant 30 minutes.



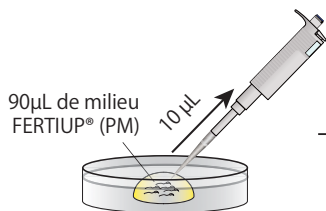
[Transfert de paillettes contenant le sperme décongelé] No. 06-02



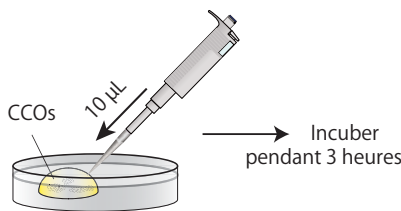
Insémination

- Pipetez 10 µL de sperme préincubé à la périphérie de la goutte au moyen d'un embout de pipette conique (Cat. No. 3520; Thermo SCIENTIFIC).
- Ajoutez 10 µL de sperme à chaque goutte de CARD MEDIUM® contenant les CCOs.
- Incubez les ovocytes et spermatozoïdes pendant 3 heures dans une étuve (37°C, 5% CO₂).

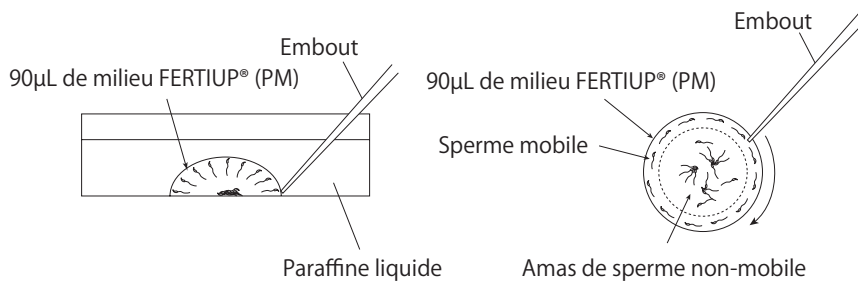
【Boîte de Pétri contenant le sperme】



【Boîte de fécondation】



[Pipetage du Sperm en Suspension depuis la périphérie de la goutte]



[Aspiration de la Suspension de Sperm Préincubé et Insémination des Ovocytes]

No. 06-03



- Après incubation, rincez les ovocytes 3 fois dans du mHTF frais dans une boîte de rinçage, en évitant de transférer du CARD MEDIUM®.

Note

Assurez-vous de ne pas manipuler les boîtes de Pétri contenant les spermatozoïdes décongelés avant qu'ils ne soient suffisamment mobiles dans le milieu. En cas de manipulation excessive des boîtes de Pétri avant que les spermatozoïdes commencent à bouger, ceux-ci ne récupéreront pas totalement leur motilité.

Remarque

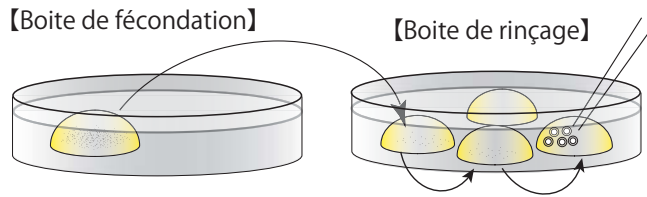
Les spermatozoïdes à haute motilité ont tendance à se regrouper à la périphérie de la goutte.

Remarque

Il est possible de pipeter 10 µL de la suspension de sperme jusqu'à 3-4 fois depuis la même goutte.

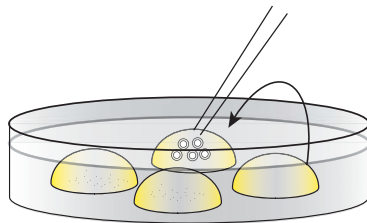
Note

Effectuez le pipetage des étapes 1 et 2 avec le plus de précaution possible.



5. Six heures après insémination, observez les ovocytes dans la troisième goutte de mHTF et éliminez les ovocytes parthénogénétiques n'ayant qu'un seul pronucléus. (Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 11)
6. Après une nuit de culture, transférez uniquement les embryons ayant atteint le stade 2 cellules dans la 4ème goutte de mHTF de la boîte de rinçage. Ces embryons peuvent être vitrifiés ou réimplantés. (Reportez-vous aux chapitres Vitrification rapide d'embryons murins en page 54 et Transfer d'embryons dans l'oviducte en page 66).

【Boite de rinçage】



Références

1. Nakagata N., and Takeshima T. 1992. High fertilizing ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. *Theriogenol.* **37**: 1283-1291.
2. Nakagata N., Ueda S., Yamanouchi K., Okamoto K., Matsuda Y., Tsuchiya T., Nishimura M., Oda S., Koyasu K., Azuma S., and Toyoda Y. 1995. Cryopreservation of wild mouse spermatozoa. *Theriogenol.* **43**: 635-643.
3. Nakagata N. 1996. Use of cryopreservation techniques of embryos and spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice and for maintenance of Tg mouse lines. *Lab. Anim. Sci.* **46**: 236-238.
4. Okamoto M., Nakagata N., Ueda O., Kamada N., and Suzuki H. 1998. Cryopreservation of gene disrupted mouse spermatozoa. *J. Mamm. Ova. Res.* **15**: 77-80.
5. Takeo T., Hoshii T., Kondo Y., Toyodome H., Arima H., Yamamura KI., Irie T., and Nakagata N. 2008. Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. *Biol Reprod.* **78**(3): 546-551.
6. Nakagawa Y., Fukumoto K., Kondo T., Koga M., Takeshita Y., Nakamura Y., Sakaguchi M., Haruguchi Y., Tsuchiyama S., Kaneko T., and Nakagata N. 2009. Fertilization ability of C57BL/6J mouse spermatozoa frozen in a dry shipper. *Exp. Anim.* **58**(3) Suppl: 297.
7. Takeo T., and Nakagata N. 2010. Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl-β-cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Lab. Anim.* **44**(2): 132-137.
8. Nakagata N. 2011. Cryopreservation of mouse spermatozoa and *in vitro* fertilization. *Methods Mol Biol.* **693**: 57-73.
9. Takeo T., Nakagata N. 2011. Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin. *Biol Reprod.* **85**(5): 1066-1072.

3-3 Méthode de ressuscitation de lignées par fécondation *In Vitro* avec spermatozoïdes congelés

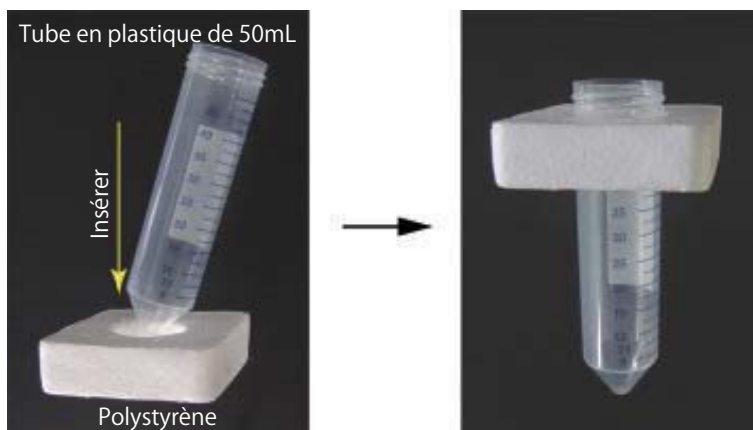
Matériel and Equipement

1. Stock de spermatozoïdes congelés
2. Souris femelle superovulée avec PMSG et hCG
3. FERTIUP® (Milieu de Préincubation: PM, Cat. No. KYD-002-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
4. CARD MEDIUM® (Cat. No. KYD-003-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
5. mHTF (Fluide tubal humain modifié)
6. Paraffine liquide
7. Bain-marie maintenu à 37°C
8. Morceau de polystyrène pour la décongélantion
9. Tube de 1.5mL (Quality Scientific Plastics 1.5ml Graduated Microcentrifuge Tube avec Flat Top Cap, Natural Cat. No. 509-GRD-Q)
10. Centrifugeuse
11. Micropipettes
12. Boîtes de Pétri en plastique (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
13. Etuve humidifiée (37°C , 5% CO₂)

Procédure

Préparation du polystyrène pour la décongélantion

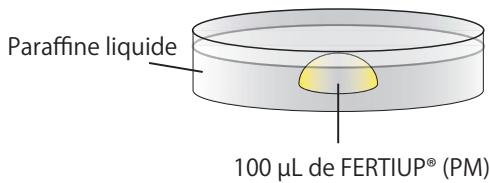
1. Découpez un morceau de polystyrène capable de faire flotter un tube de 50 mL, comme indiqué sur le schéma ci-dessous.



Préparation pour la décongélantion

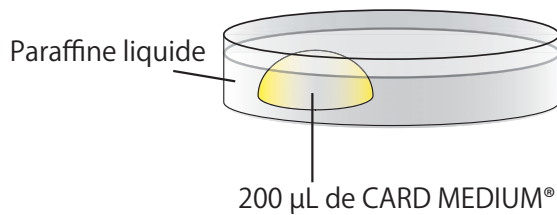
1. Maintenez le bain-marie à 37°C .
2. Versez de l'eau (37°C) dans le tube de 50 mL puis insérez-le dans le morceau de polystyrène avant de laissez flotter le tout dans le bain-marie.
3. Mettre une goutte (100 µL / goutte) de FERTIUP®(PM) dans une boîte de Pétri et recouvrez-la de paraffine liquide 30 minutes avant de commencer la décongélantion. Placez la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C ,5% CO₂ in air).

【Boite de Pétri contenant le sperme】



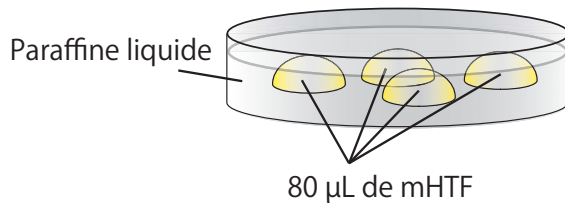
- Mettre une goutte (200 µL / goutte) de CARD MEDIUM® dans une boite de Pétri et recouvrez-la de paraffine liquide 10 minutes avant de collecter les ovocytes. Placez la boite de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂ in air).

【Boite de Pétri contenant les ovocytes】



- Mettre quatre gouttes (80 µL / drop) de mHTF dans une boite de Pétri et recouvrez-les de paraffine liquide. Placez la boite de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂ in air) au minimum 30 minutes.

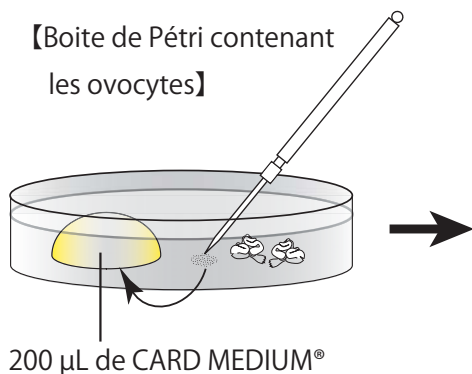
【Boite de rinçage】



Collection et préincubation des Ovocytes

- Sacrifiez une femelle 15-17 heures après injection d'hCG et disséquer les oviductes. (Se référer au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 9)
- Collectez les complexes cumulus-ovocytes (CCOs) à l'aide d'aiguilles de dissection pointues et placez 6-20 CCOs par goutte de CARD MEDIUM® (200 µL) (boite contenant les ovocytes). Préincubez pendant 60 minutes dans l'étuve.

【Boite de Pétri contenant les ovocytes】



Note

Il y a trois méthodes différentes pour préparer le CARD MEDIUM®, selon que la fécondation *in vitro* est faite à partir de sperme frais, congelé, ou réfrigéré. Reportez-vous au manuel d'instruction du CARD MEDIUM® pour plus de détails.

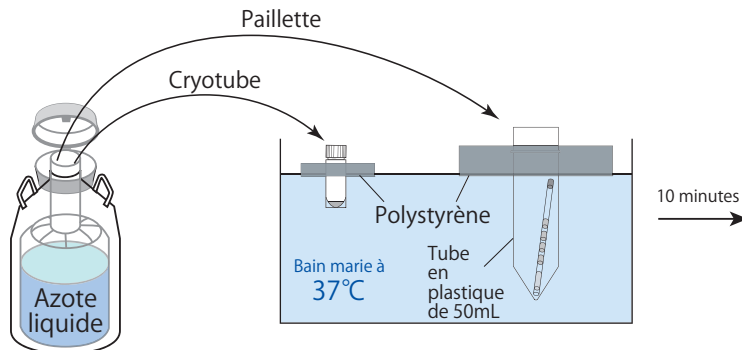
Note

Assurez-vous d'effectuer toutes les opérations, depuis l'abatage des femelles et la collecte des oviductes jusqu'à l'immersion des CCOs dans la goutte de CARD MEDIUM® en un minimum de temps (30 secondes maximum).

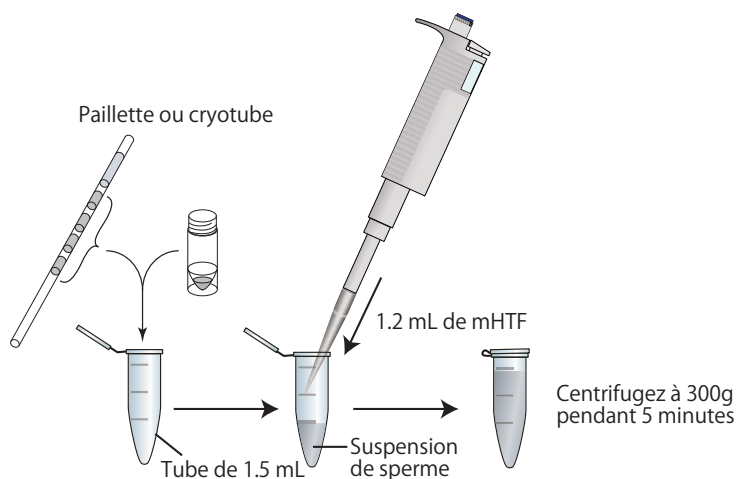
Si vous effectuez la procédure sans assistance, assurez-vous de ne pas sacrifier plusieurs souris à la fois. Il est préférable de n'abattre qu'une souris et prélever ses oviductes rapidement avant de procéder à la dissection de la souris suivante.

Décongélation de spermatozoïdes murins

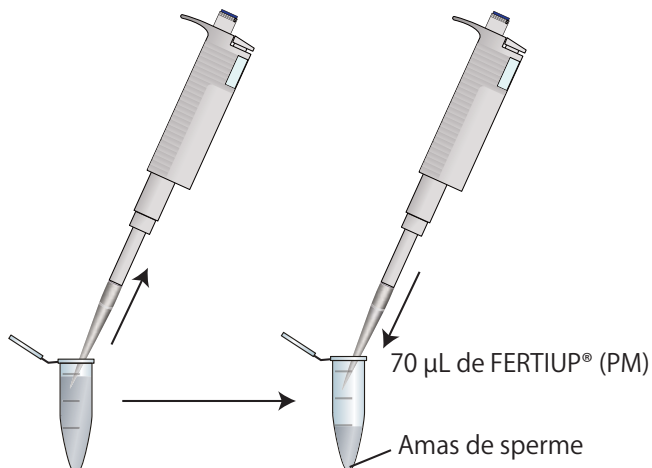
- Sortez une paille de l'azote liquide.
Si le sperme est conservé dans un cryotube, ouvrir le bouchon et vider l'azote liquide hors du tube. Immerger le cryotube dans un bain-marie à 37°C (en utilisant le tube de 50mL et le morceau de polystyrène).



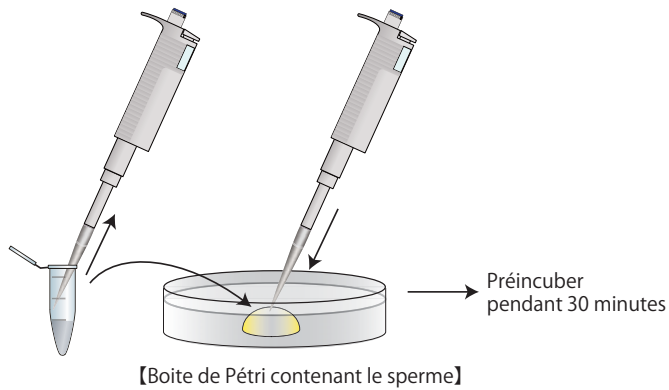
- Transférez la suspension de sperme du cryotube ou de la paille dans un tube de 1.5mL. Ajouter avec précaution 1.2mL de mHTF maintenu à 37°C, et centrifugez à 300g a température ambiante pendant 5 minutes.



- Après centrifugation, éliminez autant de surnageant que possible, et ajoutez 70 μ L de FERTIUP® (PM) maintenu à 37°C dans le tube (le volume final doit être approximativement 100 μ L).

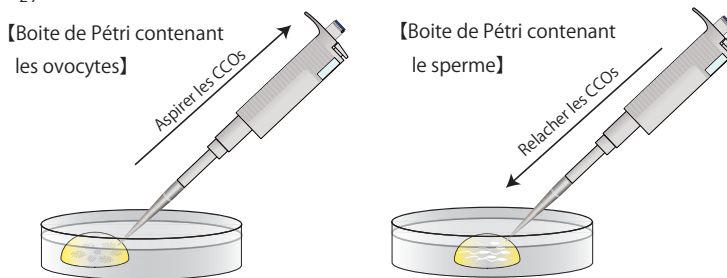


- Pipetez avec précaution, puis transférez tout le contenu dans la goutte de 100 μ L de FERTIUP® (PM) (boîte de Pétri contenant le sperme). Placez la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) pendant 30 minutes.

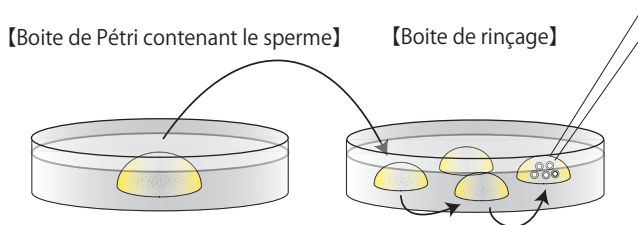


Insémination

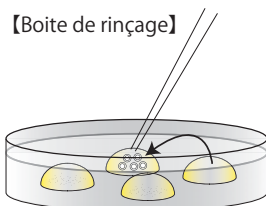
1. Pipetez les CCOs préincubés en minimisant le volume de CARD MEDIUM® transféré (boite de Pétri contenant les ovocytes). Transférez les CCOs dans la goutte de sperme en suspension (boite de Pétri contenant le sperme), puis incubez dans l'étuve (37°C , 5% CO₂).



2. Après 3 heures d'incubation, rincez les ovocytes 3 fois dans du mHTF frais (80 µL) dans la boite de rinçage.



3. Six heures après insémination, observez les ovocytes dans la troisième goutte de mHTF et éliminez les ovocytes parthénogénétiques n'ayant qu'un seul pronucléus. (Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 11)
4. Après une nuit de culture, transférez uniquement les embryons ayant atteint le stade 2 cellules dans la 4ème goutte de mHTF de la boite de rinçage. Ces embryons peuvent être vitrifiés ou réimplantés. (Reportez-vous aux chapitres Vitrification rapide d'embryons murins en page 54 et Transfer d'embryons dans l'oviducte en page 66).



Références

1. Nakagata N., Takeo T., Fukumoto K., Haruguchi Y., Kondo T., Takeshita Y., Nakamuta Y., Umeno T., and Tsuchiyama S. 2014. Rescue *in vitro* fertilization method for legacy stock of frozen mouse sperm. *J Reprod Dev.* 60(2): 167-170.

4-1 Préparation d'ovocytes microdisséqués au laser

Les spermatozoïdes cryopréservés provenant de certaines lignées, particulièrement de lignées consanguines, peuvent avoir de faibles capacités de fécondation. Afin de contrecarrer ceci, il est possible de microdisséquer les ovocytes au laser avant de procéder à la fécondation *in vitro*.

Matériel and Equipement

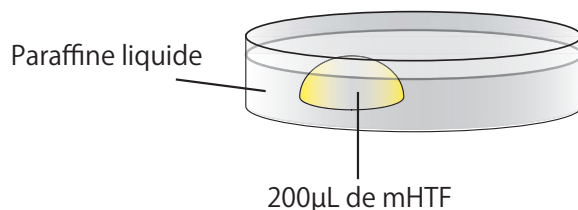
1. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
2. mHTF (Fluide tubal humain modifié)
3. Paraffine liquide
4. Hyaluronidase diluée dans du mHTF (Hyaluronidase, Cat. No. H-3506, Sigma)
5. Système laser Saturn 3 (Research Instruments Ltd, Cornwall, UK)
6. Etuve humidifiée (37°C, 5% CO₂)

Procédure

Préparation du sperme et des boîtes de culture

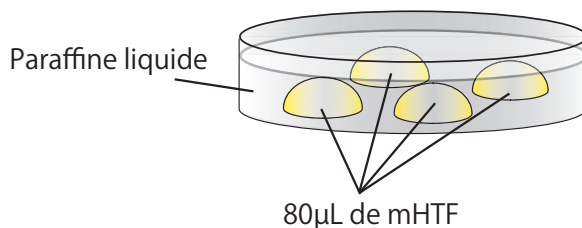
1. Pour la FIV, le sperme doit être préparé en suivant les méthodes décrites aux chapitres Fécondation *In Vitro* en page 8, Fécondation *In Vitro* avec sperme épидидymaire transporté à basse température en page 18, ou Fécondation *In Vitro* avec spermatozoïdes congelés en page 28.
2. Placer 1 goutte de 200 μL de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrir la avec de la paraffine liquide. Placer la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) au minimum 30 minutes.

【Boîte contenant la Hyaluronidase】



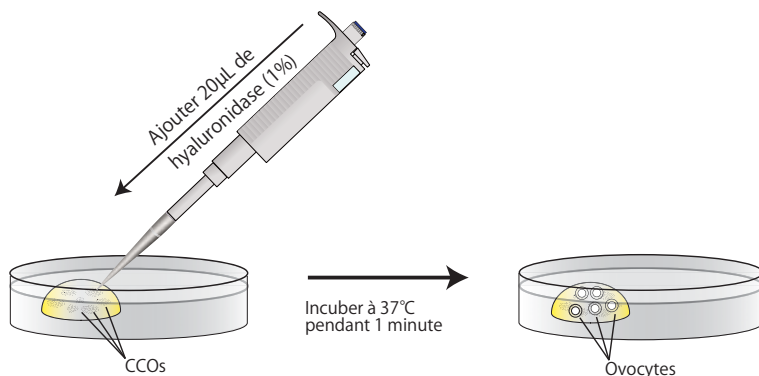
3. Placer 4 gouttes (80 μL / goutte) de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrir avec de la paraffine liquide. Placer la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) 30 minutes minimum.

【Boîte de rinçage】

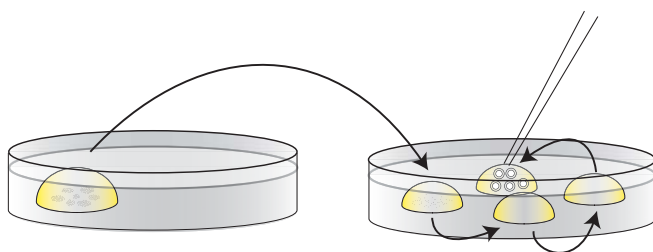


Préparation des ovocytes dénudés

1. Collecter les complexes cumulus-ovocytes (CCOs) des femelles superovulées et introduisez-les dans une goutte de 200 μL de mHTF (boîte contenant de la Hyaluronidase).
(Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 6 et 9).
2. Ajouter 20 μL de hyaluronidase (1%) à la goutte de mHTF contenant les CCOs, et placer la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO_2) pendant 1 minute.

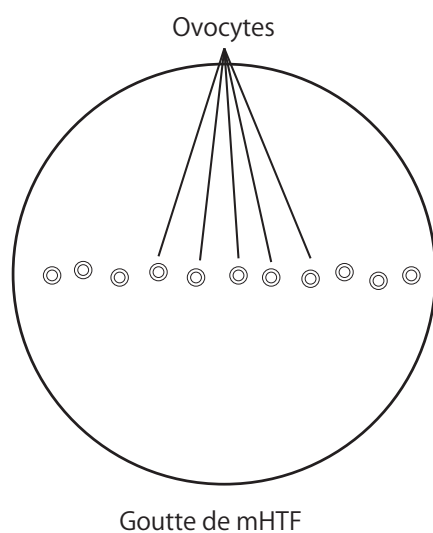


3. Transférer rapidement les ovocytes dans la première goutte de 80 μL de mHTF (boîte de rinçage), puis rincer les ovocytes dans les gouttes successives.



Dissection de la zone pellucide au laser

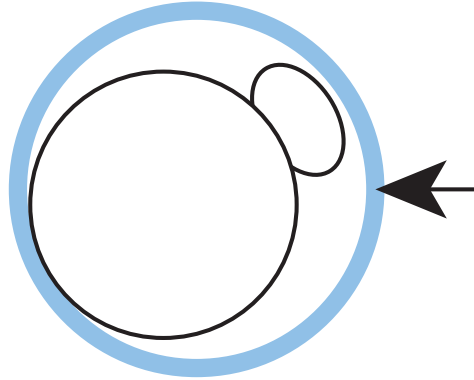
1. Placer une goutte de 100 μL de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrir la avec de la paraffine liquide. Placer la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO_2) au minimum 30 minutes.
2. Transférer 50 ovocytes dénudés dans une goutte de 100 μL de mHTF.
3. Aligner les ovocytes sur le fond de la boîte.



Remarque

Si les cellules folliculaires collent à la zone pellucide, celles-ci peuvent être décollées par simple trituration avec la pipette en verre.

4. Placer la boîte contenant les ovocytes en position dans le système laser Saturn 3.
5. Cibler la zone pellucide à proximité du premier globule polaire and perforer-la avec le faisceau laser.



[Dissection de la Zone Pellucide au Laser] No. 08-01



6. Une fois la zone pellucide de tous les ovocytes perforée, transférer-les dans une goutte de CARD MEDIUM® pour y être fécondés.
Placer la boîte dans l'étuve.
(Reportez-vous aux chapitres Fécondation *In Vitro* en page 6, Fécondation *In Vitro* avec sperme épидидymaire transporté à basse température en page 18, et Fécondation *In Vitro* avec spermatozoïdes congelés en page 26).

Références

1. Kaneko T., Yanagi M., Nakashima T., and Nakagata N. 2006. The improvement in fertility of cryopreserved mouse spermatozoa showing low fertility using laser-microdissected oocytes. *Reprod. Med. Biol.* 5(4): 249-254.
2. Anzai M., Nishiwaki M., Yanagi M., Nakashima T., Kaneko T., Taguchi Y., Tokoro M., Shin SW., Mitani T., Kato H., Matsumoto K., Nakagata N., and Iritani A. 2006. Application of laser-assisted zona drilling to *in vitro* fertilization of cryopreserved mouse oocytes with spermatozoa from a subfertile transgenic mouse. *J Reprod Dev.* 52(5): 601-606.

Note

Pour éviter d'endommager la membrane plasmique des ovocytes, il est recommandé d'orienter le laser là où la zone pellucide est la plus détachée de l'ovocyte.

Note

Le diamètre du trou doit être 10-12.5 μm et la durée du pulse 0.55-0.60 ms.

4-2 Dissection Partielle de la Zone Pellucide (DPZ)

Si vous ne disposez pas d'instruments de microdissection assistée au laser, vous pouvez tout de même disséquer la zone pellucide des ovocytes manuellement avec un stéréomicroscope.

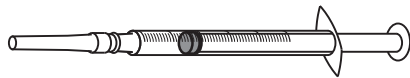
Matériel and Equipement

1. Souris femelles superovulées par PMSG et hCG
(Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 6)
2. mHTF (Fluide tubal humain modifié)
3. Hyaluronidase diluée dans du mHTF (Hyaluronidase, Cat. No. H-3506, Sigma)
4. sucrose 0.3M (BSA-)
5. sucrose 0.3M (BSA+)
6. Paraffine liquide
7. Boîtes de Petri en plastique (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
8. Embouts de pipettes (volume de 10 -100 μ L)
9. Micropipette

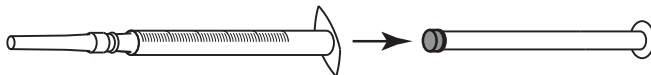
Procédure

Préparation de l'aiguille pour la DPZ

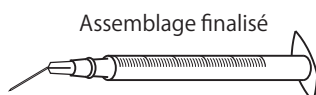
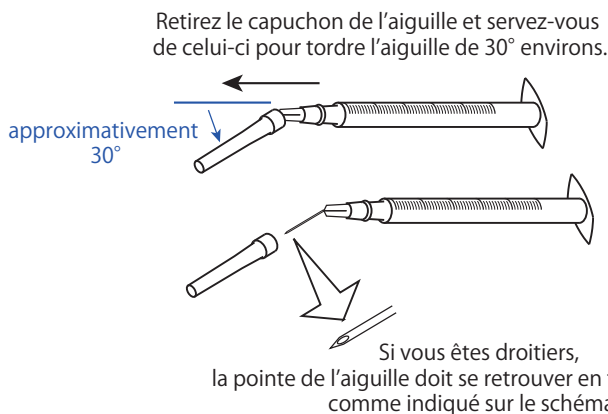
1. Préparer une seringue à usage unique montée avec une aiguille de 30 gauges en suivant la procédure décrite sur le schéma ci-dessous.



Préparer une seringue de 1 mL avec une aiguille de 30 G.



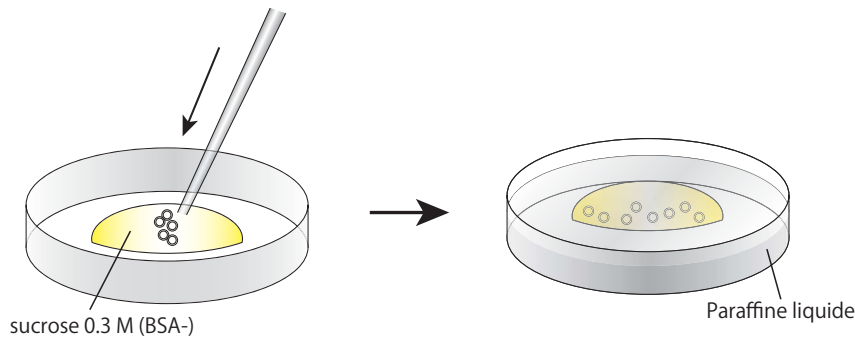
Retirez et débarrassez-vous du piston.



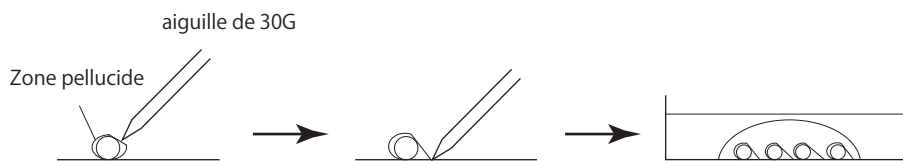
Assemblage finalisé


DPZ

1. Collecter les ovocytes des femelles superovulées 14 à 15 heures après les avoir injectées avec l'hCG. Purifier les ovocytes avec la hyaluronidase.
(Reportez-vous aux chapitres Fécondation *In Vitro* en page 9 et préparation des ovocytes microdisséqués au laser en page 37).
2. Introduire les ovocytes dénudés dans la phase supérieure d'une goutte de 100 µL de sucrose 0.3M (BSA-) dans une boîte de culture.
3. Une fois que les ovocytes touchent le fond de la goutte, recouvrez-la de paraffine liquide.

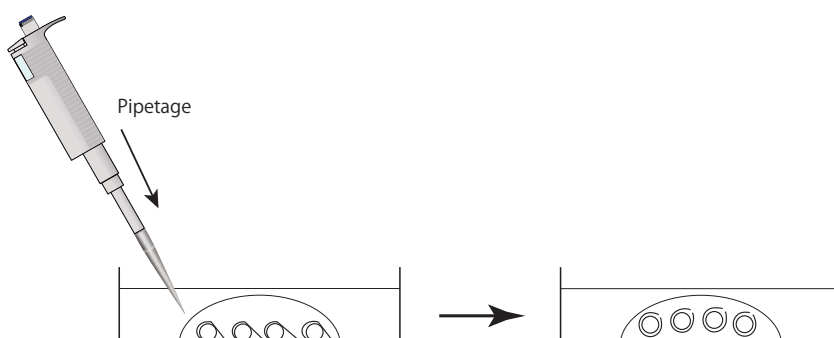


4. Sous le stéréomicroscope, disséquer partiellement la zone pellucide (DPZ) des ovocytes en exerçant un mouvement descendant unique de l'aiguille de 30 gauges.



[DPZ] No. 09-01 

5. Après dissection partielle, neutraliser les attractions électrostatiques entre la zone pellucide et la surface de la boîte de culture en ajoutant 20 µL de sucrose 0.3M (BSA+) à la goutte.
6. Pour détacher les ovocytes partiellement disséqués de la boîte de culture, ajouter la solution de sucrose sur les ovocytes au moyen d'une micropipette.



7. Rincer les ovocytes partiellement disséqués 3 fois dans le CARD MEDIUM® pour éliminer le sucrose résiduel.

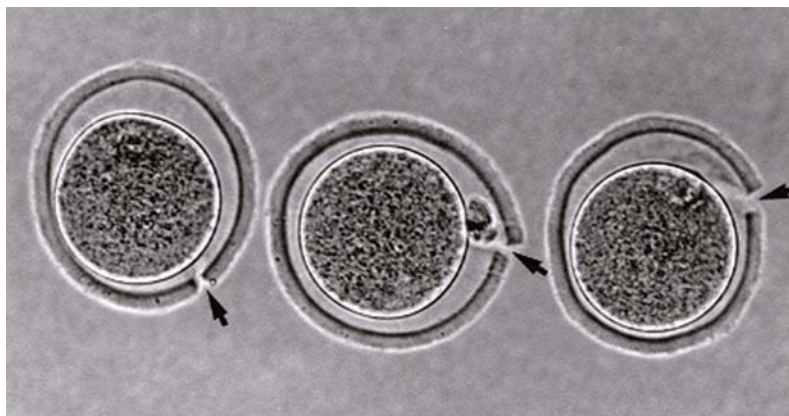
Remarque

Lorsque les ovocytes sont placés dans le sucrose 0.3M (BSA-), l'ovoplasme se contracte à cause des forces osmotiques et électrostatiques qui se créent entre la zone pellucide et la surface de la boîte de culture.

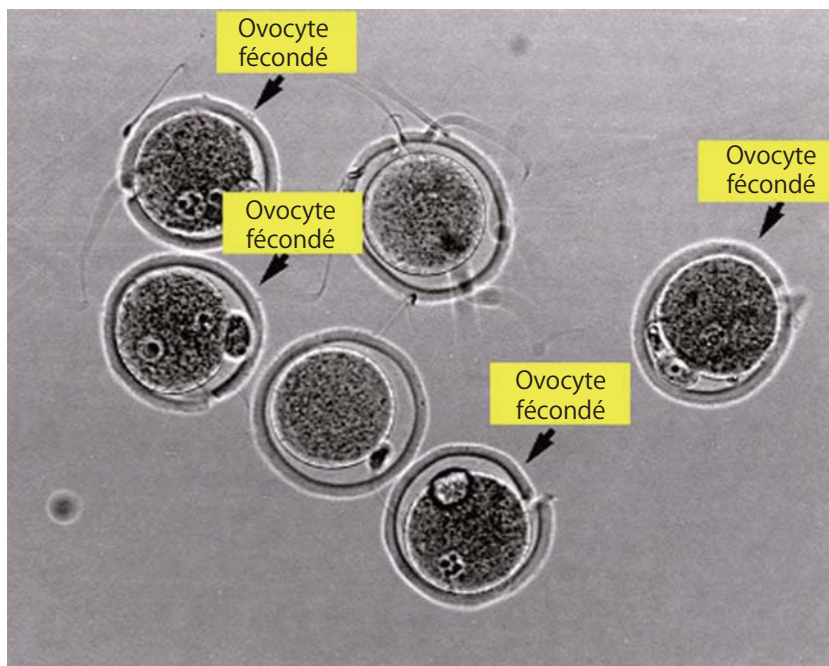
Il en résulte un élargissement de l'espace périvitellin et les ovocytes se retrouvent collés au fond de la boîte de culture.

Remarque

Appliquez le sucrose à l'opposé de la fente pour éviter aux ovocytes d'être expulsés de leur zone pellucide.

[Micrographe : Ovocytes partiellement disséqués]**Fécondation *In Vitro* et transfert d'embryons**

1. Introduire les ovocytes partiellement disséqués dans le CARD MEDIUM® contenant le sperme préparé au préalable (insémination).
(Reportez-vous aux chapitres Fécondation *In Vitro* en page 6, Fécondation *In Vitro* avec sperme épидидymaire transporté à basse température en page 18, et Fécondation *In Vitro* avec spermatozoïdes congelés en page 26).
2. Trois heures après insémination, rincer les ovocytes fécondés avec précaution dans du mHTF, puis placez-les en culture pendant 3 jours jusqu'à ce qu'ils atteignent le stade blastocyste.

[Micrographe : Ovocytes fécondés]

3. Transférez les blastocystes dans l'utérus d'une femelle receveuse synchronisée au 3ème jour de pseudogestation.
Reportez-vous au chapitre Réimplantation d'embryons par l'utérus en page 72.

Références

1. Nakagata N., Okamoto M., Ueda O., and Suzuki H. 1997. The positive effect of partial zona-pellucida dissection on the *in vitro* fertilizing capacity of cryopreserved C57BL/6J transgenic mouse spermatozoa of low motility. *Biol. Reprod.* 57: 1050-1055.

Remarque

Le transfert d'embryons au stade 2 cellules dans l'oviducte de receveuses synchronisées au 1er jour de pseudogestation résulte en un très faible taux de développement des embryons. Ceci est dû au fait que les blastomères des embryons sont expulsés de la zone pellucide car ils subissent l'action péristaltique de l'oviducte lors de leur progression de l'oviducte jusqu'à l'utérus.

4-3 Collecte d'embryons au stade 2 cellules

Matériel and Equipement

1. Une paire de forceps watchmaker's #5
2. Ciseaux de dissection
3. KSOM/AA
4. Paraffine liquide
5. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
6. Seringue de 1 mL
7. Aiguille (30G tordue)
8. Micropipettes en verre

Procédure

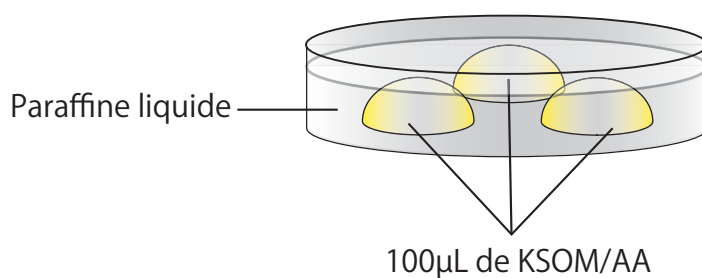
Superovulation et sélection des femelles synchronisées

1. Injecter les femelles (âgées de 10 à 12 semaines) par voie i.p. avec 7.5 IU de PMSG (14:00-18:00).
2. Injecter les femelles par voie i.p. avec 7.5 IU de hCG 48 à 52 heures après l'injection de PMSG, puis accouplez-les immédiatement avec les males.
3. Le lendemain, examiner les femelles pour identifier celles présentant un bouchon vaginal (synchronisées).

Préparation des boîtes de culture

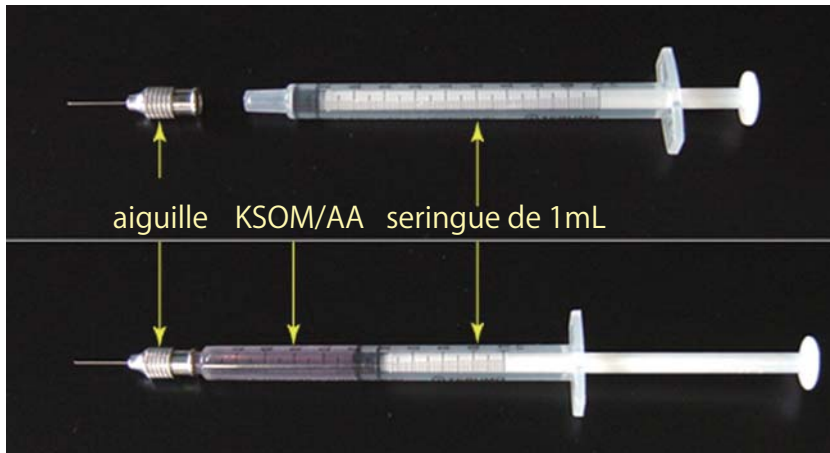
1. Placer 3 gouttes (100 μ L / goutte) de KSOM/AA dans une boîte de Pétri et recouvrir avec de la paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) au minimum 30 minutes.

【Boîte de rinçage】



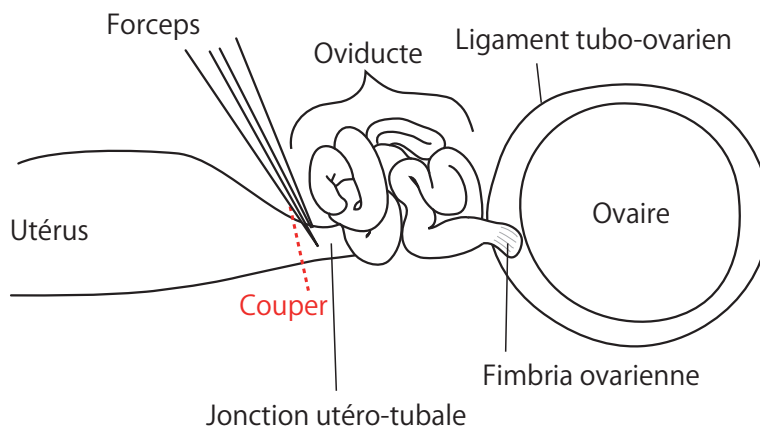
Préparation de l'aiguille

1. Remplir une seringue de KSOM/AA et connectez-la à une aiguille tordue.
2. Tester la seringue en vous assurant qu'elle ne contienne pas de bulles d'air, et que le flux de KSOM/AA est régulier.

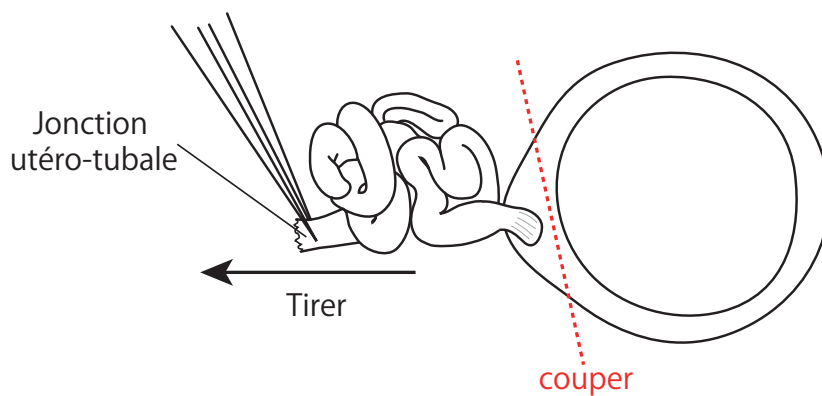


Collection d'embryons

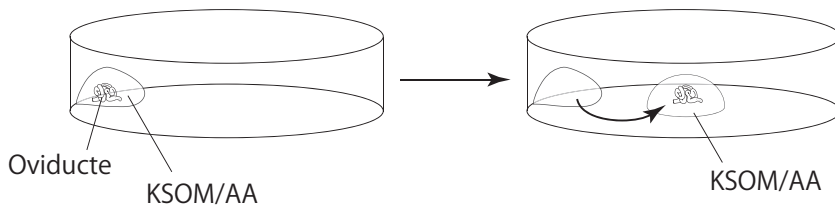
1. Le jour suivant l'identification du bouchon vaginal, disséquer les utérus, oviductes et ovaires, et placez le tout sur un papier filtre stérilisé. (Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 9.)
2. Immobiliser la jonction utéro-tubale et inciser du côté de l'utérus.



3. Tirer sur la jonction utéro-tubale pour séparer l'infundibulum de l'ovaire et couper le ligament tubo-ovarien.

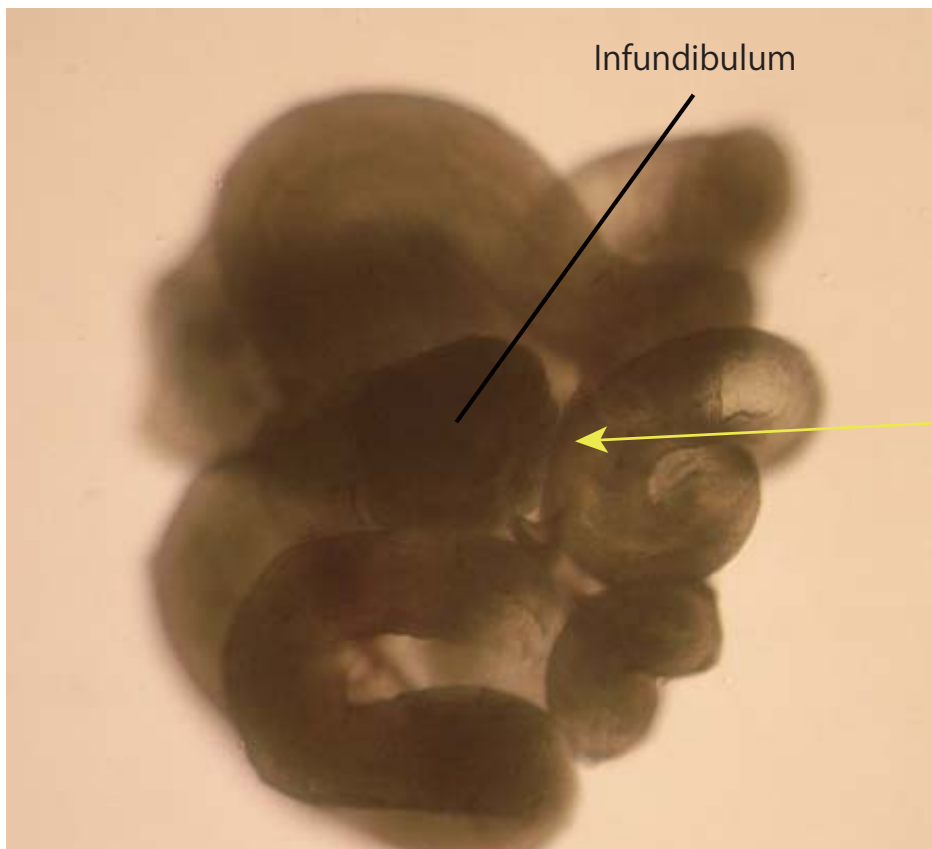


- Après avoir rincé l'oviducte dans une goutte de KSOM/AA, placer-le dans une nouvelle goutte de KSOM/AA.



- Examiner l'oviducte pour localiser l'infundibulum, qui est l'élargissement de l'oviducte à son extrémité.
- Orienter l'oviducte pour permettre à l'aiguille d'être insérée facilement.

[Micrographe : Un oviducte avant manipulation]



- Maintenez l'infundibulum au fond de la boîte de Pétri à l'aide de forceps et insérez-y l'aiguille.

Note

L'infundibulum est souvent caché à l'intérieur des replis de l'oviducte. Par conséquent, l'utilisation de forceps est fortement recommandée pour dérouler avec précaution l'utérus et localiser l'infundibulum.

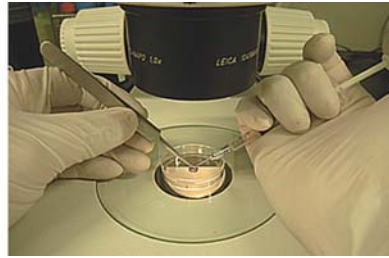
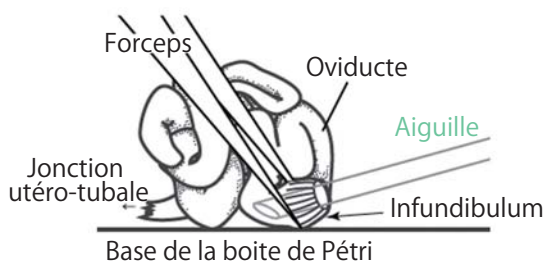
Remarque

Si vous êtes droitier, positionner l'oviducte comme indiqué sur le schéma ci-dessous. Il est plus facile d'introduire l'aiguille dans l'infundibulum dans cette position (comme l'indique la flèche jaune).

Note

L'infundibulum est extrêmement fragile. Les forceps doivent par conséquent être utilisés avec précaution.

8. Presser délicatement le piston pour créer un flux de KSOM/AA dans l'oviducte.

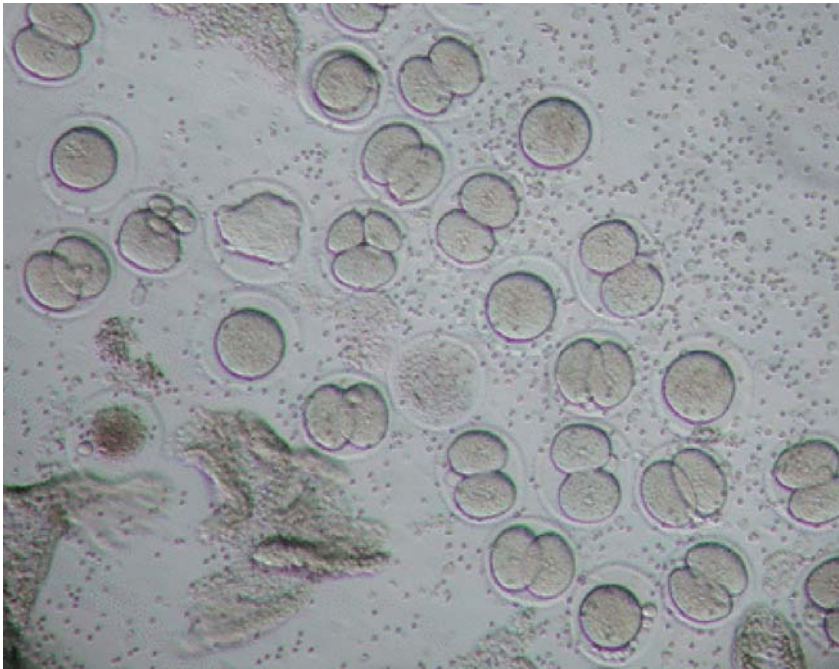


[Manipulation] No. 10-01



9. Collecter les embryons avec un aspirateur buccal et rincer-les dans plusieurs gouttes de KSOM/AA.

[Micrographe : Après avoir expulsé les embryons des Oviductes]



Note

La visualisation de l'expansion de l'oviducte générée par le flux de KSOM/AA indique une manipulation réussie. Il n'est pas recommandé d'introduire l'aiguille n'importe où dans l'oviducte à l'aveugle sous peine d'abimer l'infundibulum et de compromettre la pénétration de l'aiguille.

Note

Assurez-vous d'effectuer toutes les opérations, depuis l'abatage des femelles jusqu'à la manipulation des oviductes en un temps minimum (moins de 5 minutes). Si vous effectuez la procédure sans assistance, assurez-vous de ne pas sacrifier plusieurs souris à la fois. Il est préférable de n'abattre qu'une souris et manipuler ses oviductes rapidement avant de procéder à la dissection de la souris suivante.

Références

1. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., and Behringer R. 2003. Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (Third edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-591-9.