

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 *In Vitro* (FIV) 6
- 1-3 Fécondation *In Vitro* (FIV) après Ultra-Superovulation 12

Chapitre 2 Transport de sperme

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

Chapitre 3 Congélation de sperme

- 3-1 Congélation de spermatozoïdes murins 20
- 3-2 Fécondation *In Vitro* avec spermatozoïdes congelés 26
- 3-3 Méthode de ressuscitation de lignées par Fécondation *In Vitro* 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.

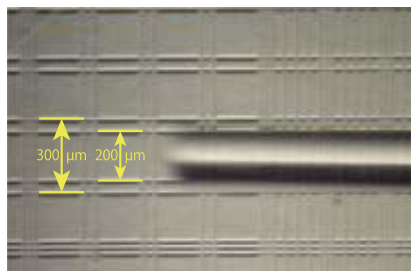
Préparation de pipettes pour la manipulation d'embryons

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]



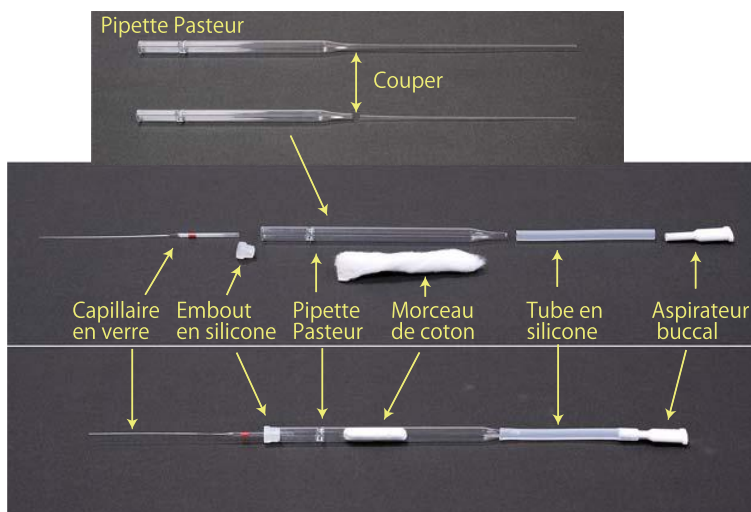
[Bout du capillaire une fois poli]

[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 1mL
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)

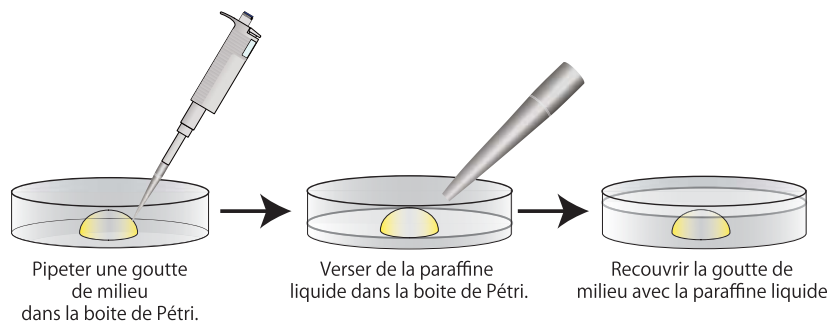
Procédure

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.

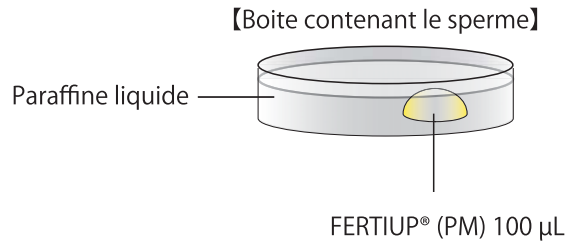
Préparation de boîtes de culture

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.



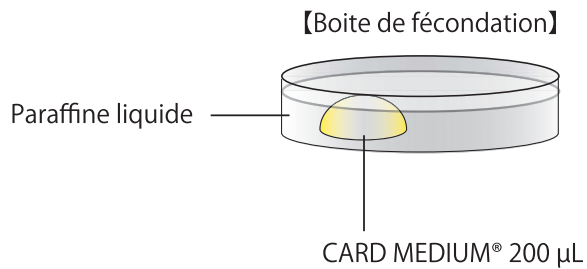
a. Boîte contenant le sperme

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.



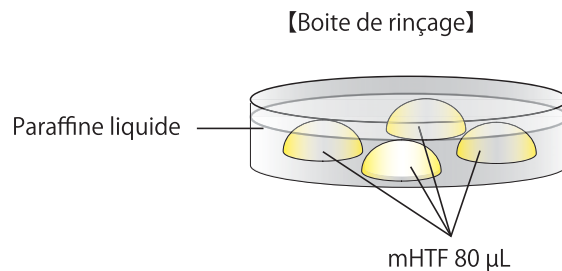
b. Boîte de fécondation

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.

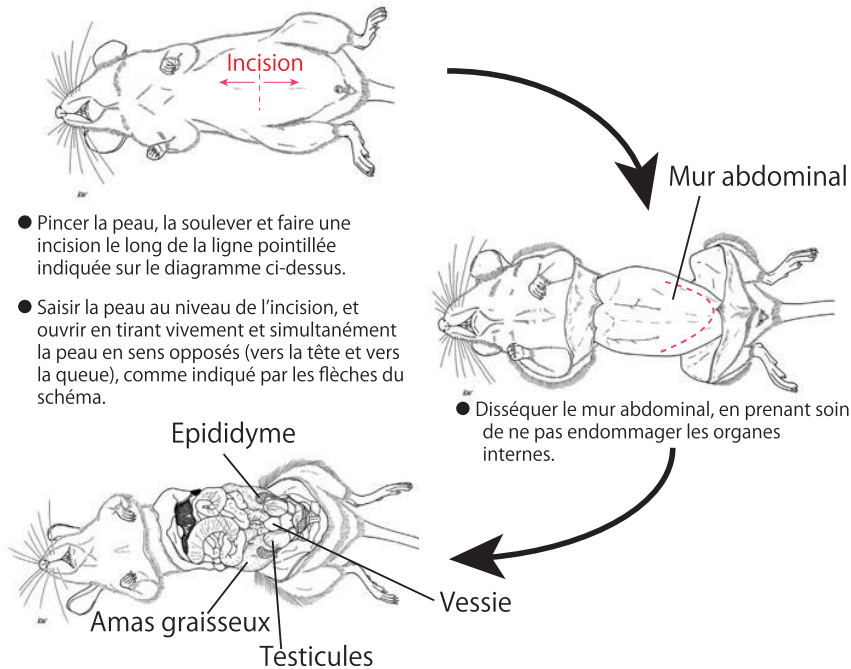


Note

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.



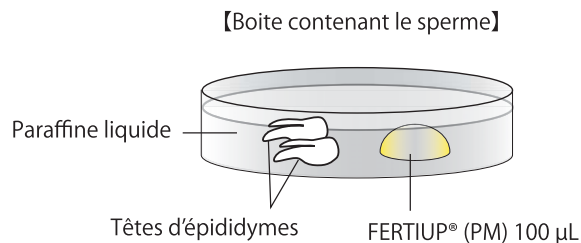
- Pincer la peau, la soulever et faire une incision le long de la ligne pointillée indiquée sur le diagramme ci-dessus.
- Saisir la peau au niveau de l'incision, et ouvrir en tirant vivement et simultanément la peau en sens opposés (vers la tête et vers la queue), comme indiqué par les flèches du schéma.

- Disséquer le mur abdominal, en prenant soin de ne pas endommager les organes internes.

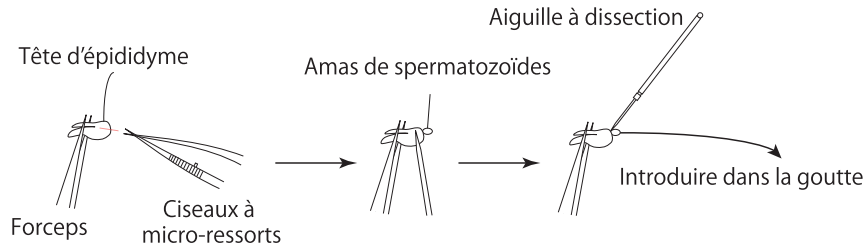
[Prélever les têtes d'épididymes] No. 02-01



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).

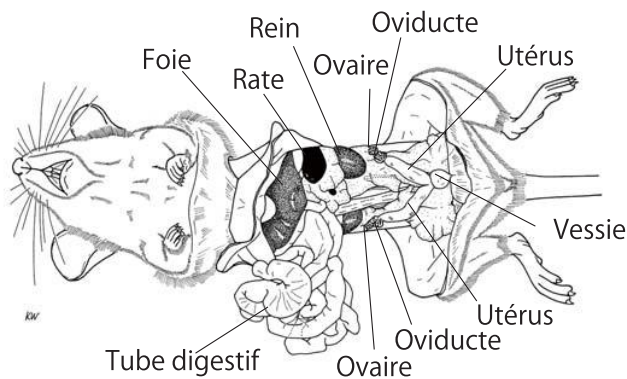


[Expulser les spermatozoïdes] No. 02-02

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

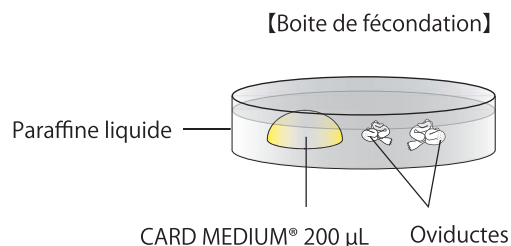
Collection des Ovocytes

- 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

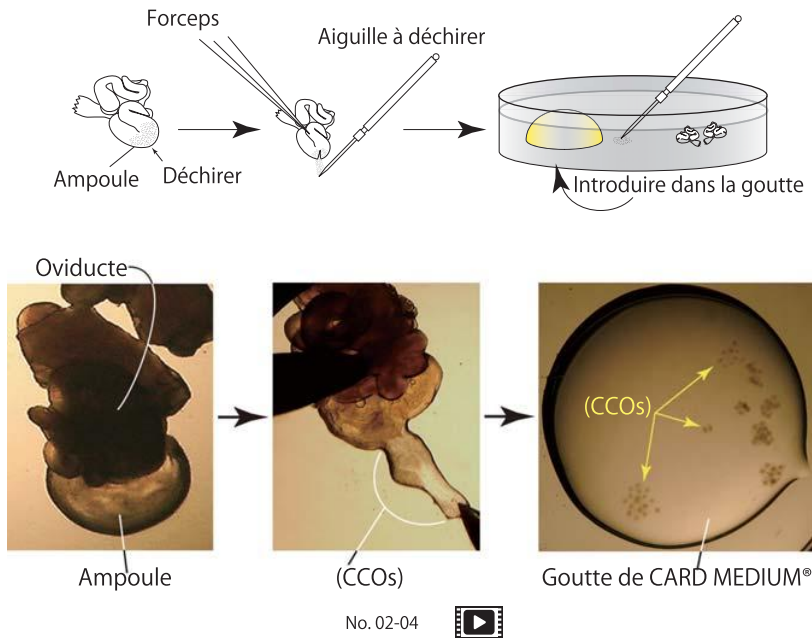
Le degré de fertilité varie énormément selon le type de spermatozoïdes utilisés.

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).

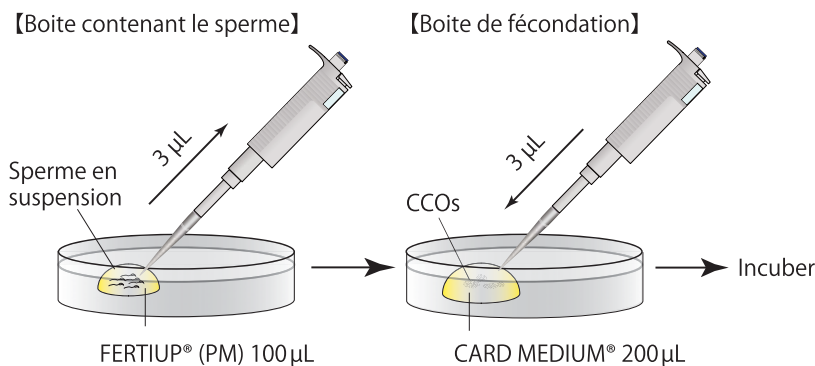
[Introduire les Complexes Cumulus-Ovocytes (CCOs) dans une goutte de CARD MEDIUM®]



- 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).

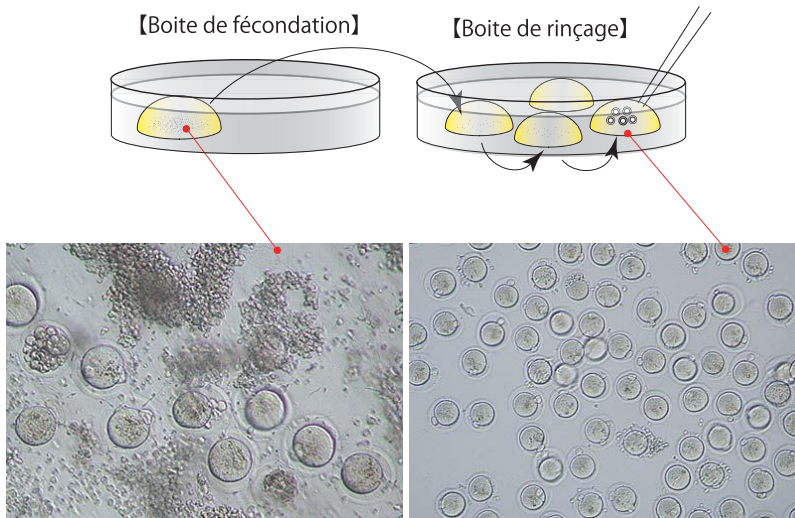


Note

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.

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

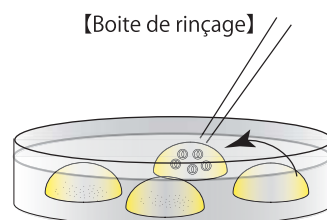


- 6 heures après insémination, observez les ovocytes dans la 3ème goutte de mHTF et éliminez tout ovocyte parthénogénétique (n'ayant qu'un seul pronucléus).

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



- 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