

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

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

Matériel and Equipement

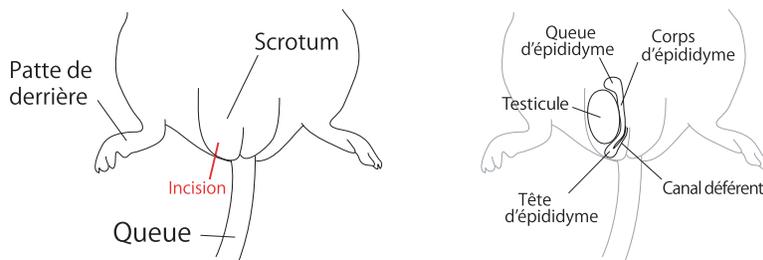
1. Souris male (âgée de 12 semaines)
2. Anesthésiants
3. Plaque chauffante (37°C)
4. Ciseaux de précision
5. Une paire de forceps watchmaker's #5
6. Clips de suture (Autoclip 9 mm; Clay Adams 427631) et applicateur de clips (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams 427630)
7. Moniteur de température (Thermochron 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.

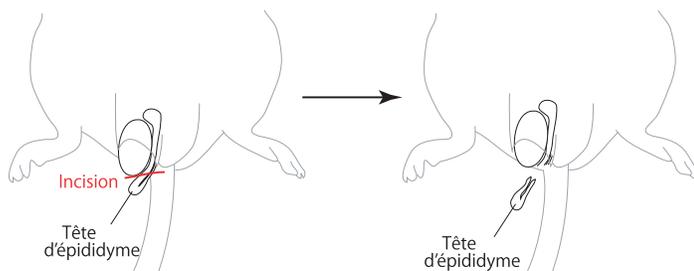
Procédure

Collection des têtes d'épididymes

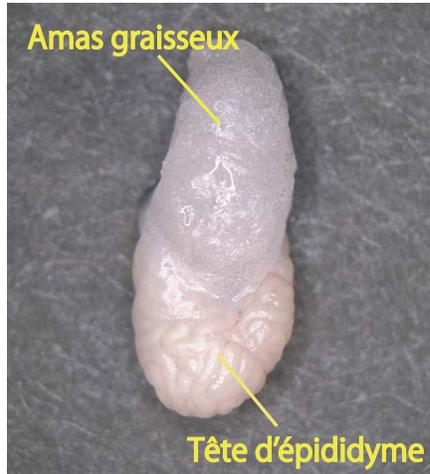
1. Anesthésier la souris male.
2. Faire une petite incision au niveau du scrotum pour faire sortir la tête d'épididyme.



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

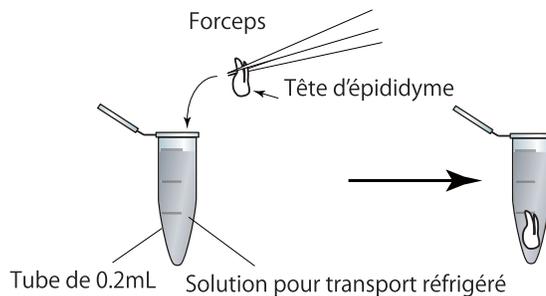


4. Replacer les testicules dans l'abdomen et suturer à l'aide de clips.
5. Maintenir la souris sur la plaque chauffante à 37°C jusqu'à ce que l'effet des anesthésiants ait complètement disparu.

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.



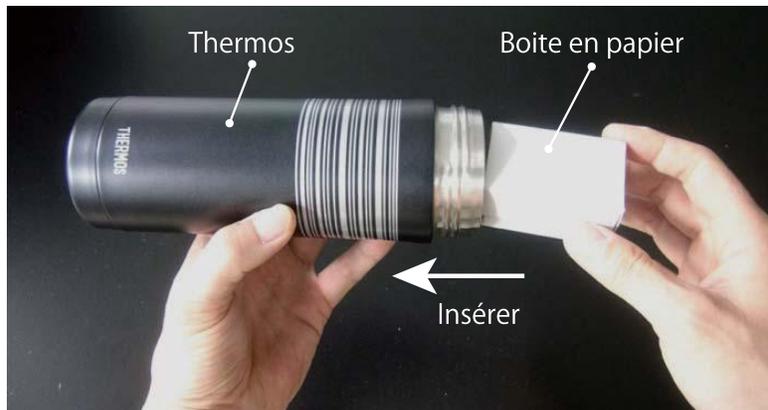
2. Placez le tube contenant les têtes d'épididymes, le moniteur de température, et le morceau de coton dans la boîte en papier.



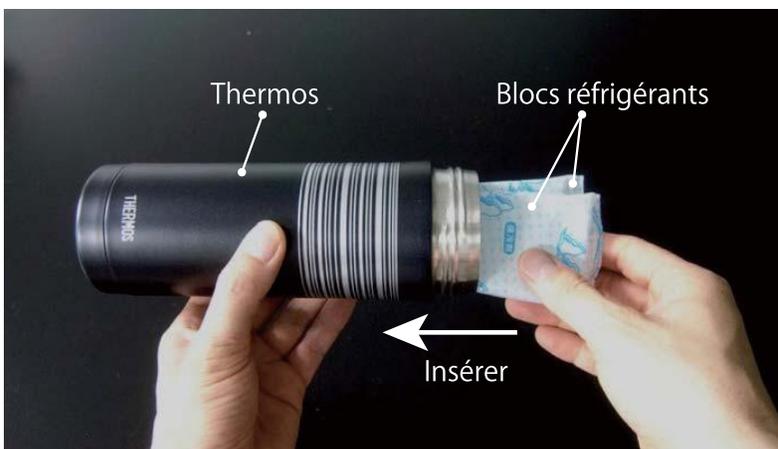
Remarque

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

- Placez la boîte en papier dans le thermos.



- Placer deux petits blocs réfrigérants dans le thermos.



- Visser le couvercle du thermos.



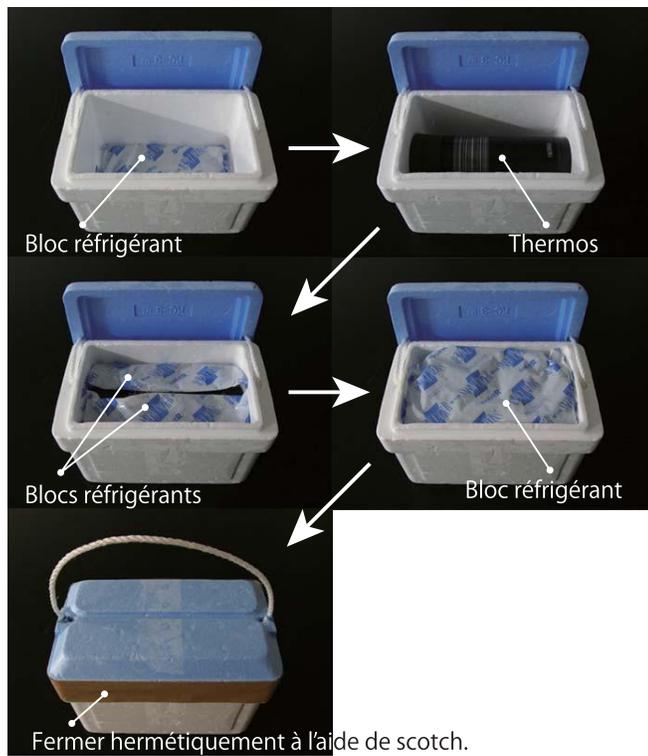
- Mettre un grand bloc réfrigérant au fond du conteneur en polystyrène et placer le thermos par dessus.
- Ajouter un grand bloc réfrigérant de chaque côté du thermos, et un dernier par dessus.
- Mettre le couvercle du conteneur en place et attacher le avec du scotch.

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

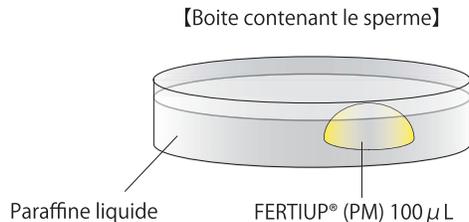
Matériel et Equipement

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

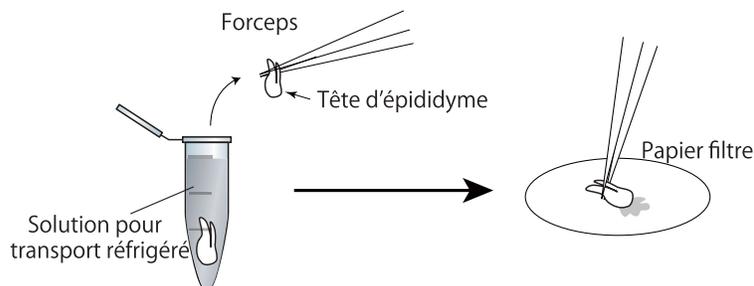
1. Pipetez une goutte (100 µL / goutte) de FERTIUP®(PM) dans une boîte de Pétri and recouvrez-la avec de la paraffine liquide 30 minutes avant de collecter le sperme épидидymaire transporté à basse température, et placer la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO₂)



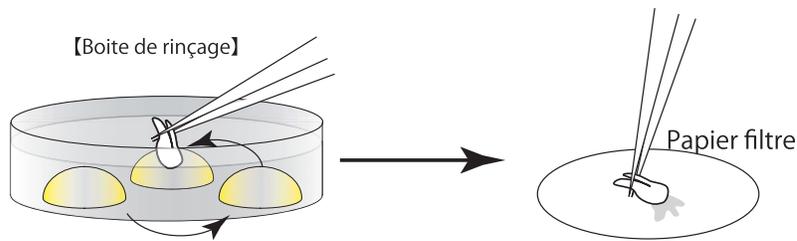
2. Retirez le tube de 0.2mL du conteneur de transport en polystyrène.

[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.



- 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.



- 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

- 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.