

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

3-1 Cryopréservation de spermatozoïdes murins

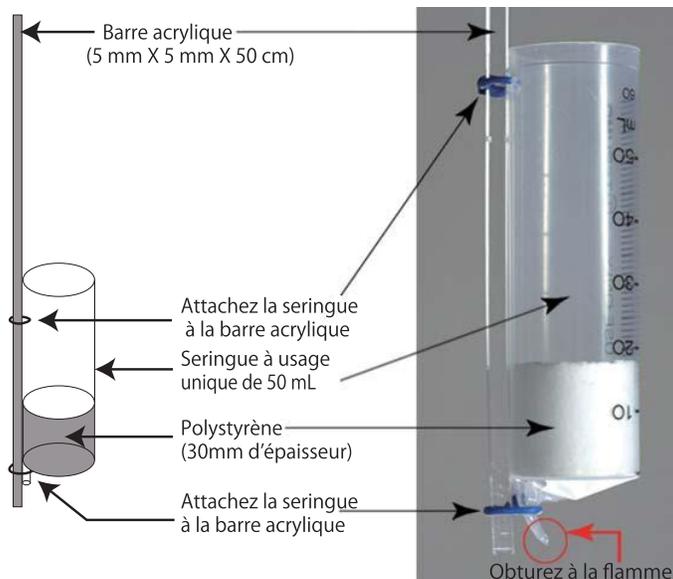
Matériel and Equipement

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

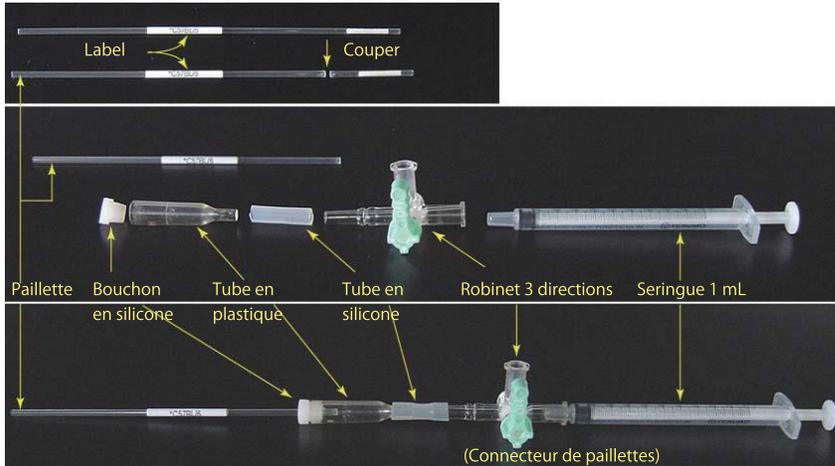
1. Insérer fermement un morceau de polystyrène au fond de la seringue.
2. Obturez le bout de la seringue en le faisant fondre dans une flamme.
3. Attachez la seringue à une barre en acrylique.



Préparation du connecteur de paillettes

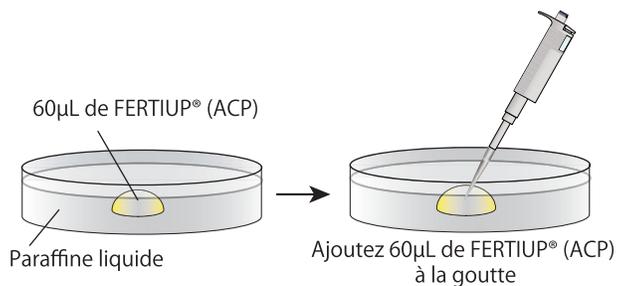
1. Assemblez une seringue 1 mL, un robinet 3 directions, un tube en silicone, un embout en plastique, et un bouchon de silicone comme indiqué sur le schéma ci-dessous.
2. Pour utiliser le connecteur de paillettes, il suffit de couper la paillette pour se débarrasser du bouchon en coton, puis enfiler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

1. [Assemblage du connecteur de paillettes]

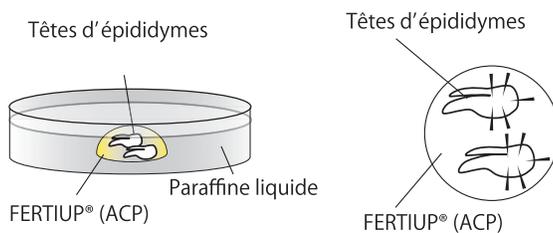


Préparation de la suspension de sperme

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.

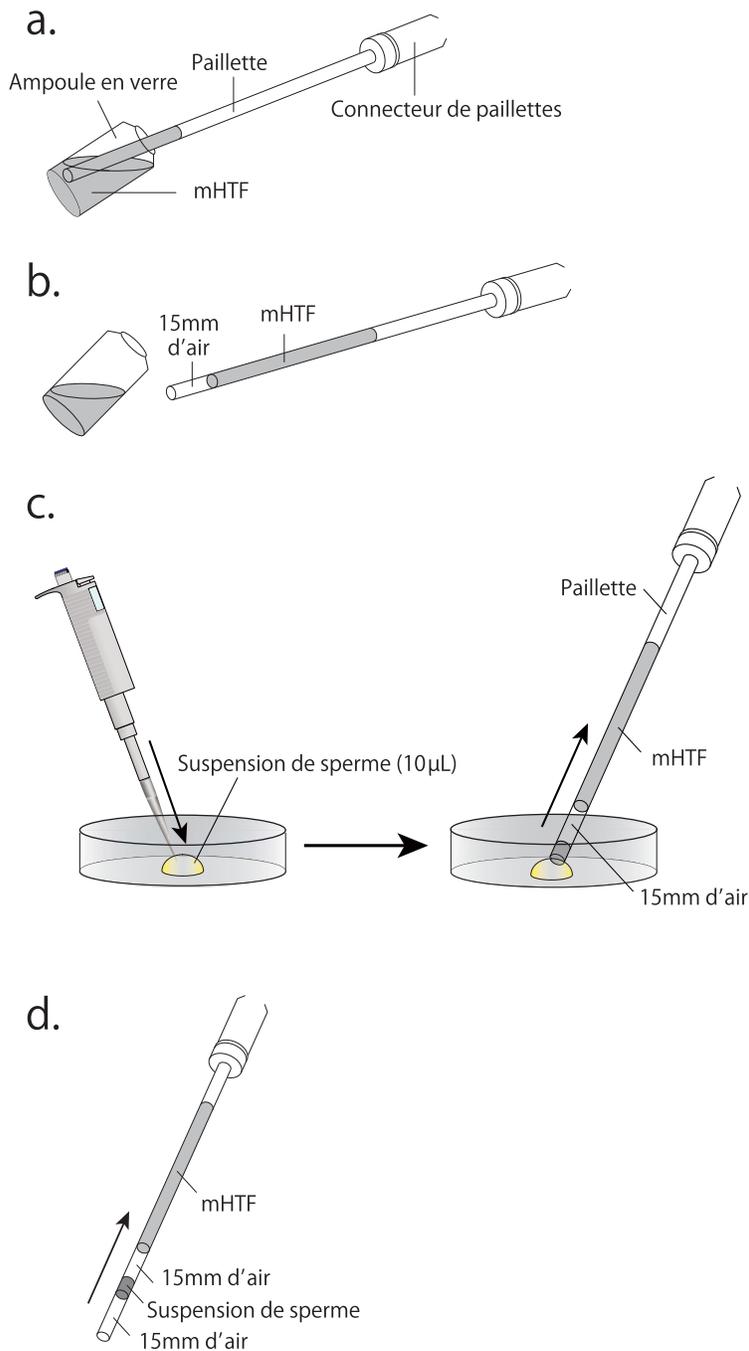


- Placer la boîte sur la plaque chauffante à 37°C pendant 3 minutes et faites faire de petites rotations à la boîte pour disperser le sperme dans le FERTIUP® (ACP) chaque minute.

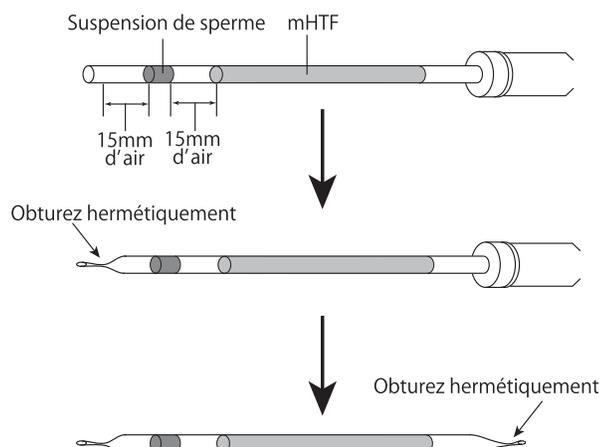
[Dissection des têtes d'épididymes et préparation de la suspension de sperme] No. 05-01 

Préparer les paillettes contenant le sperme en suspension

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



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



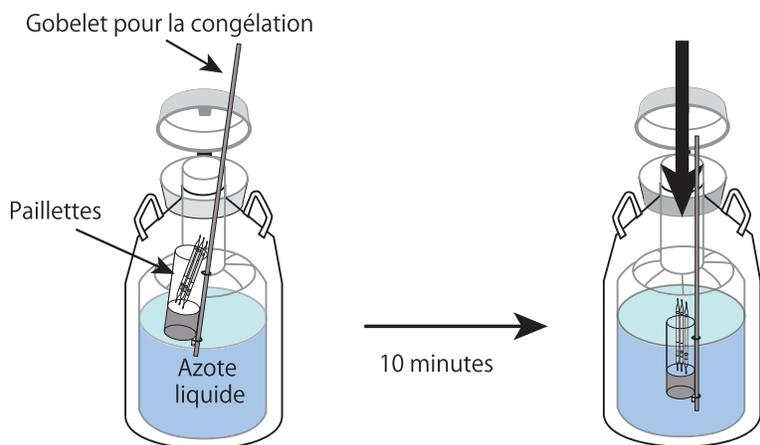
4. Répétez la procédure pour collecter 10 échantillons par souris de la même manière.

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.

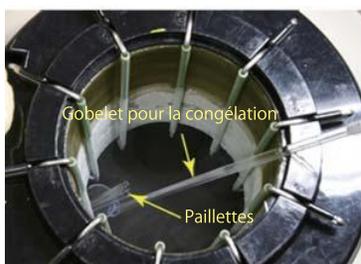
Congélation de sperme dans une cuve cryobiologique

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]

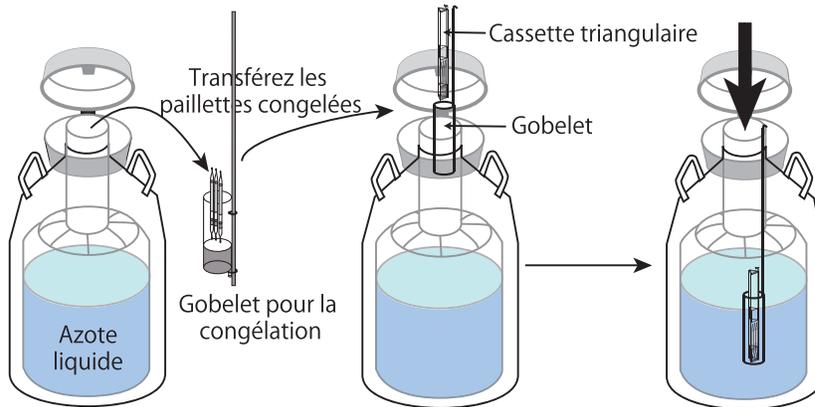
[Gobelet immergé dans l'azote liquide]



10 minutes

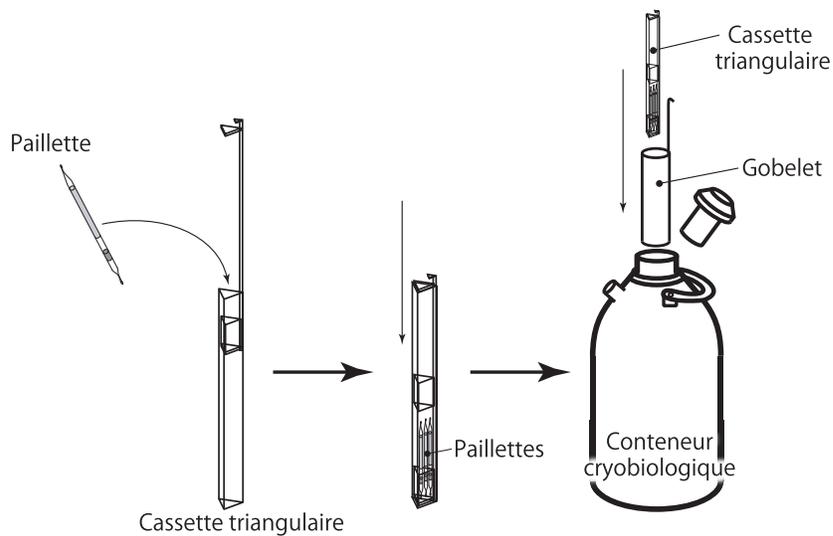


- Retirez le gobelet de l'azote liquide et transférez les paillettes dans une cassette triangulaire pour un stockage à long terme dans une cuve à azote liquide.



Congélation de sperme dans un conteneur cryobiologique

- Transférez les paillettes dans une cassette triangulaire.
- Placez la cassette triangulaire dans un gobelet pré-frigorifié.
- 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 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., Nakamuta 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

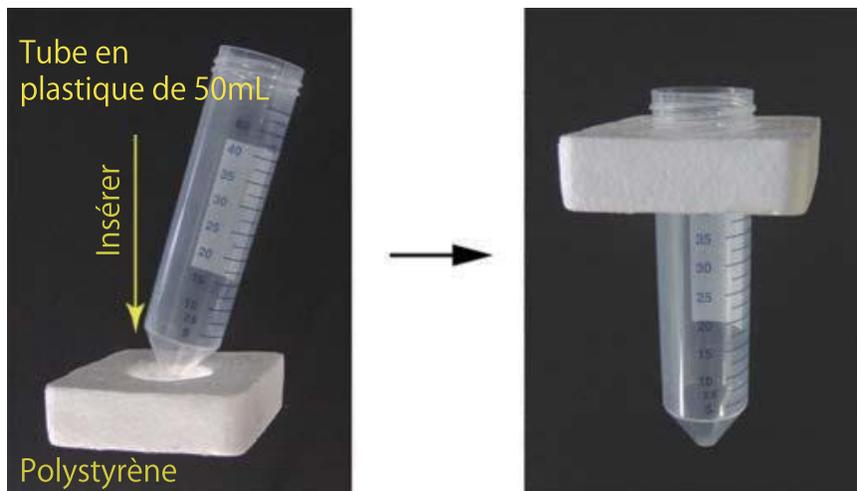
Matériel and Equipement

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

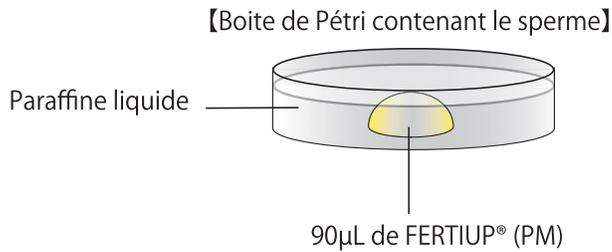
Préparation du polystyrène pour la décongélation

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

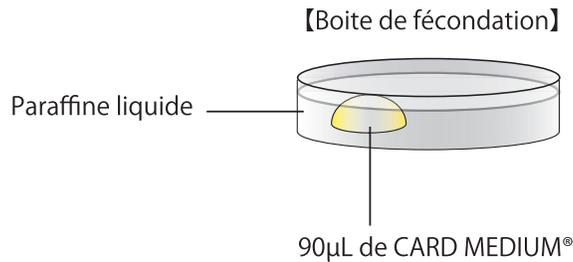


Préparation pour la décongélation

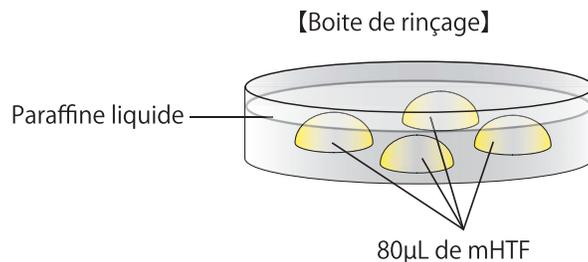
1. Maintenez le bain-marie à 37°C .
2. Versez de l'eau (37°C) dans le tube de 50 mL puis insérez-le dans le morceau de polystyrène avant de laissez flotter le tout dans le bain-marie.
3. Mettre une goutte (90 μ L / goutte) de FERTIUP® (PM) dans une boîte de Pétri et recouvrez-la de paraffine liquide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



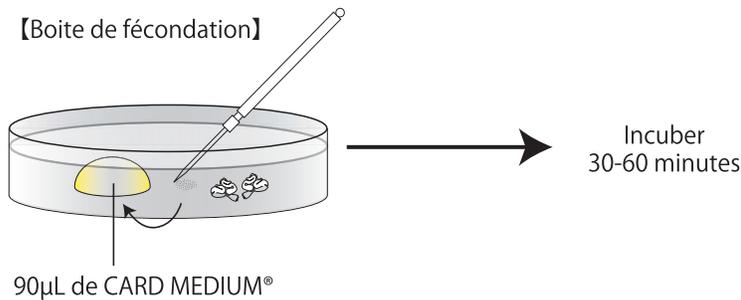
5. Mettre quatre gouttes (80 μ L / goutte) de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrez-les de paraffine liquide. Placez la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) au minimum 30 minutes.

**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.

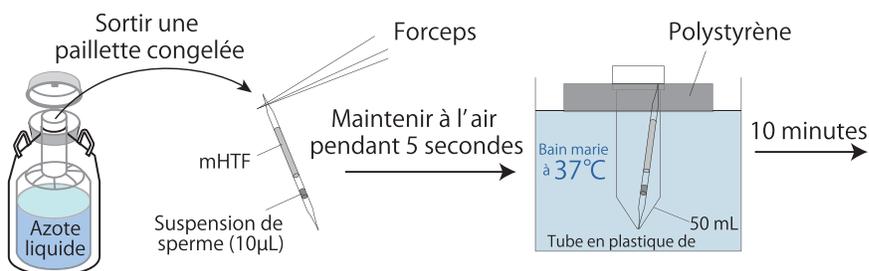
Collection des Ovocytes

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.



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. Essuyez la paille avec du papier filtre.



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.

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.

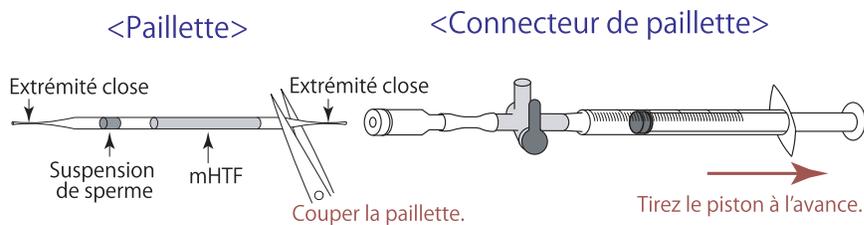
Si la paille n'est pas maintenue dans le bain-marie assez longtemps (10 minutes) la motilité des spermatozoïdes décongelés sera réduite.

[Décongélation de Spermatozoïdes murins] No. 06-01

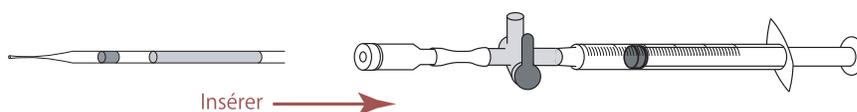


Transfert et préincubation de la suspension de sperme décongelée

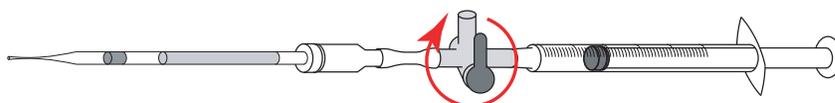
1. Tirez légèrement le piston hors de la seringue du connecteur de paillettes, et coupez la paillette aux ciseaux entre le mHTF et l'extrémité de la paillette.



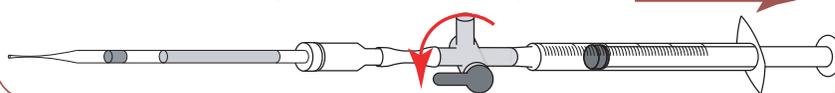
2. Insérez la paillette dans le connecteur.



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

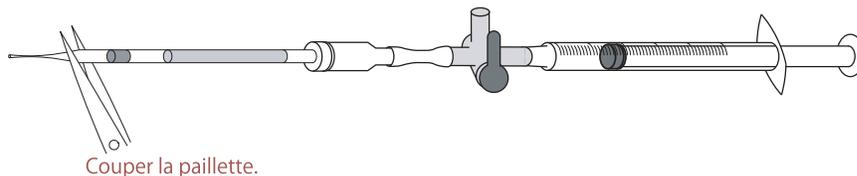


Si vous avez omis de tirer le piston à l'avance, vous pouvez le faire après avoir ouvert le robinet (en le tournant vers l'avant).

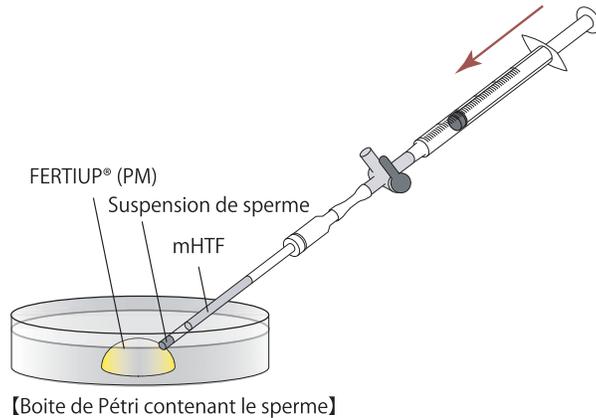


4. Refermez le robinet et coupez la paillette entre l'extrémité et la suspension de sperme.

Refermez le robinet en le mettant en position verticale.



5. 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.

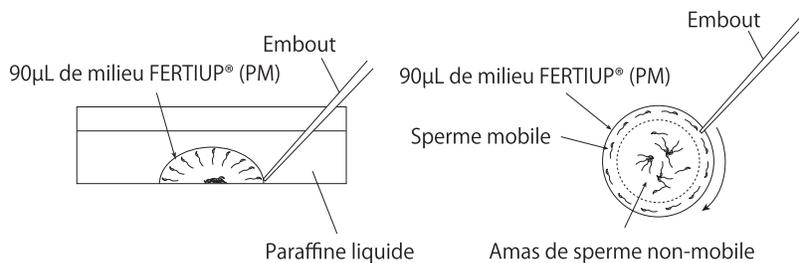
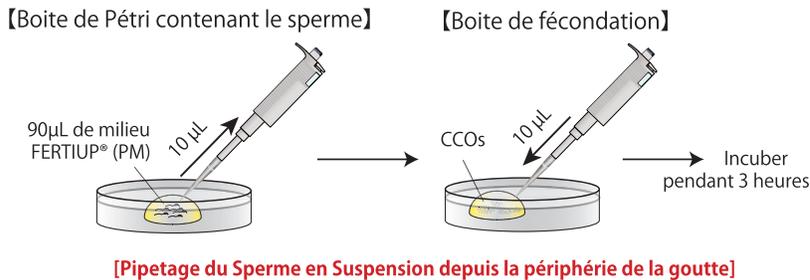


[Transfert de paillettes contenant le sperme décongelé] No. 06-02



Insémination

1. 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).
2. Ajoutez 10 µL de sperme à chaque goutte de CARD MEDIUM® contenant les CCOs.
3. Incubez les ovocytes et spermatozoïdes pendant 3 heures dans une étuve (37°C, 5% CO₂).



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

No. 06-03

4. 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

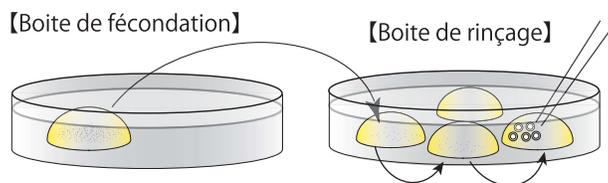
Les spermatozoïdes à haute motilité ont tendance à se regrouper à la périphérie de la goutte.

Remarque

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

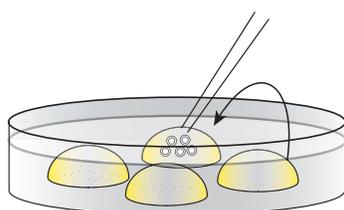
Note

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 le 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 Transfert d'embryons dans l'oviducte en page 66).

【Boîte 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 Kl., 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., Nakamuta 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

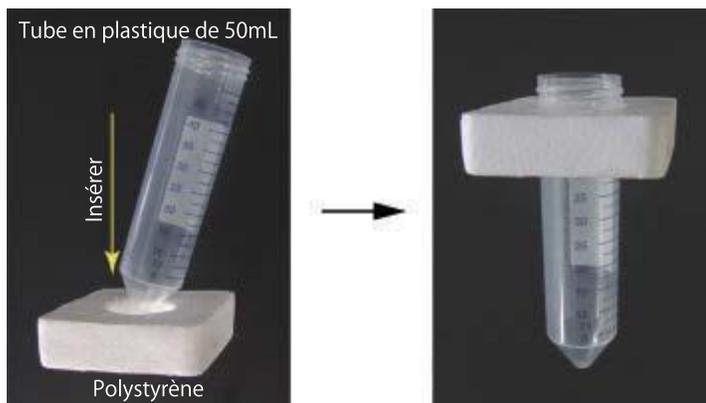
Matériel and Equipement

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 décongélation
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 décongélation

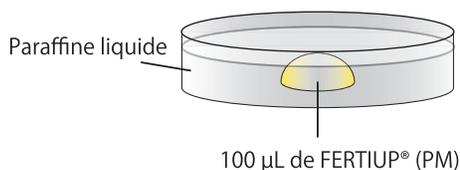
1. Découpez un morceau de polystyrène capable de faire flotter un tube de 50 mL, comme indiqué sur le schéma ci-dessous.



Préparation pour la décongélation

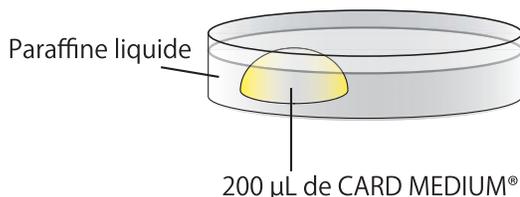
1. Maintenez le bain-marie à 37°C .
2. Versez de l'eau (37°C) dans le tube de 50 mL puis insérez-le dans le morceau de polystyrène avant de laissez flotter le tout dans le bain-marie.
3. Mettre une goutte (100 µL / goutte) de FERTIUP®(PM) dans une boîte de Pétri et recouvrez-la de paraffine liquide 30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

【Boite de Pétri contenant le sperme】



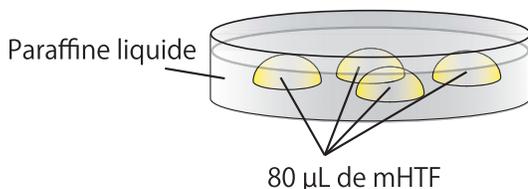
- Mettre une goutte (200 µL / goutte) de CARD MEDIUM® dans une boite de Pétri et recouvrez-la de paraffine liquide 10 minutes avant de collecter les ovocytes. Placez la boite de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂ in air).

【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.

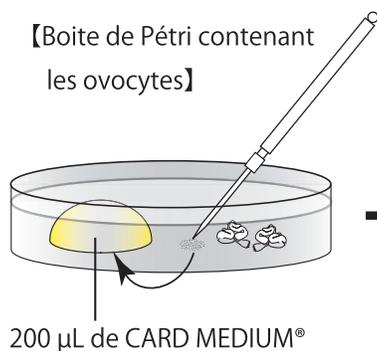
【Boite de rinçage】



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】



Préincuber pendant 60 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.

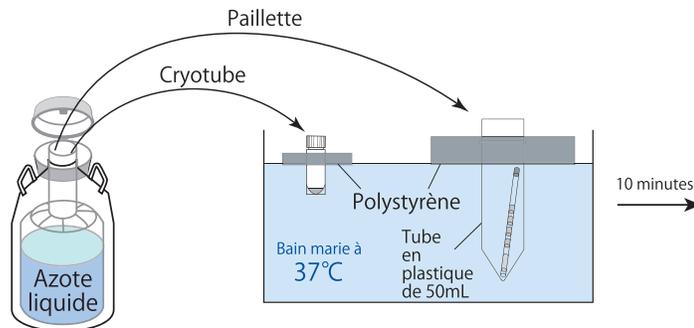
Note

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).

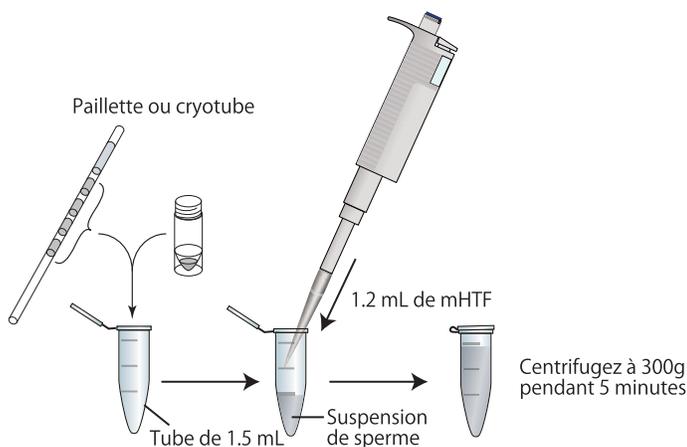
Si vous effectuez la procédure sans assistance, assurez-vous de ne pas sacrifier plusieurs souris à la fois. Il est préférable de n'abattre qu'une souris et prélever ses oviductes rapidement avant de procéder à la dissection de la souris suivante.

Décongélation de spermatozoïdes murins

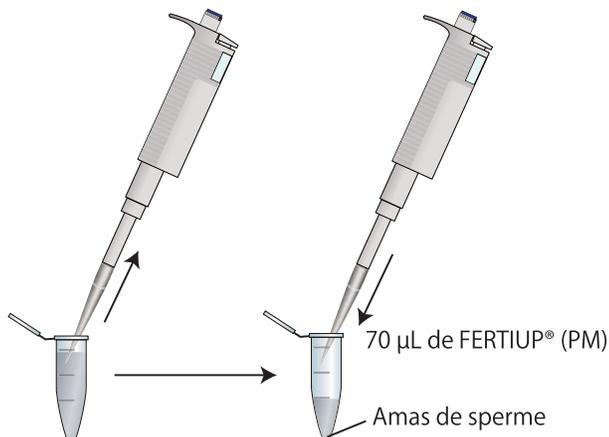
- Sortez une paille de l'azote liquide.
Si le sperme est conservé dans un cryotube, ouvrir le bouchon et vider l'azote liquide hors du tube. Immerger le cryotube dans un bain-marie à 37°C (en utilisant le tube de 50mL et le morceau de polystyrène).



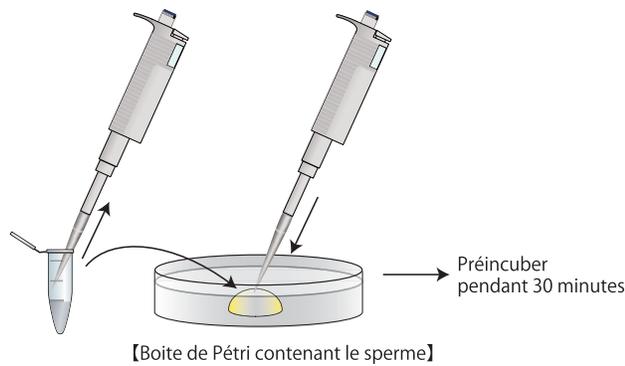
- Transférez la suspension de sperme du cryotube ou de la paille dans un tube de 1.5mL. Ajouter avec précaution 1.2mL de mHTF maintenu à 37°C, et centrifugez à 300g a température ambiante pendant 5 minutes.



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

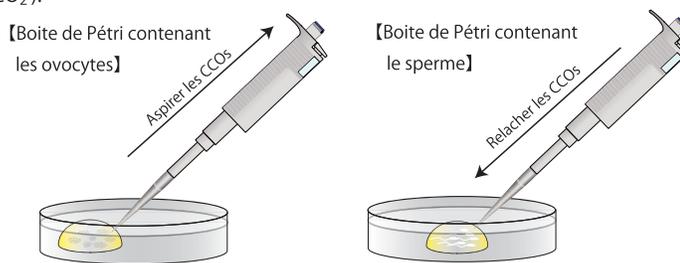


- Pipetez avec précaution, puis transférez tout le contenu dans la goutte de 100 µL de FERTIUP® (PM) (boîte de Pétri contenant le sperme). Placez la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) pendant 30 minutes.

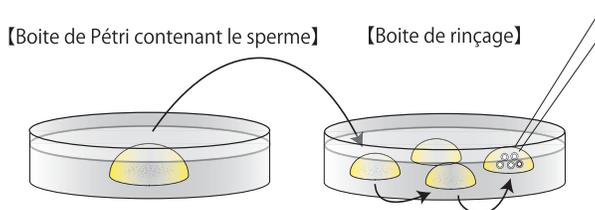


Insémination

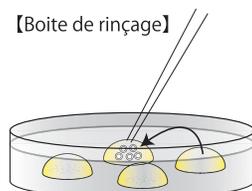
1. Pipetez les CCOs préincubés en minimisant le volume de CARD MEDIUM® transféré (boîte de Pétri contenant les ovocytes). Transférez les CCOs dans la goutte de sperme en suspension (boîte de Pétri contenant le sperme), puis incubez dans l'étuve (37°C, 5% CO₂).



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



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.