

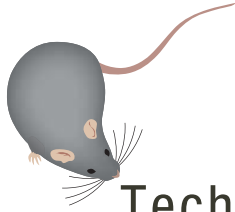
# Techniques d'ingénierie reproductive de la Souris

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

## 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

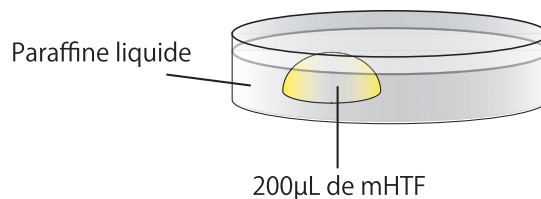
1. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
2. mHTF (Fluide tubal humain modifié)
3. Paraffine liquide
4. Hyaluronidase diluée dans du mHTF (Hyaluronidase, Cat. No. H-3506, Sigma)
5. Système laser Saturn 3 (Research Instruments Ltd, Cornwall, UK)
6. Etuve humidifiée (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)

### Procédure

#### Préparation du sperme et des boîtes de culture

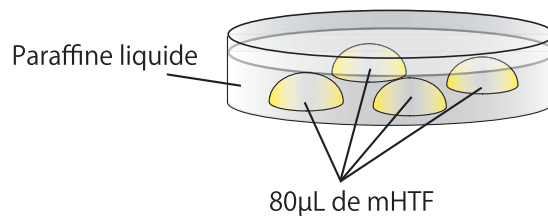
1. Pour la FIV, le sperme doit être préparé en suivant les méthodes décrites aux chapitres Fécondation *In Vitro* en page 8, Fécondation *In Vitro* avec sperme épидидymaire transporté à basse température en page 18, ou Fécondation *In Vitro* avec spermatozoïdes congelés en page 28.
2. Placer 1 goutte 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% CO<sub>2</sub>) au minimum 30 minutes.

#### 【Boîte contenant la Hyaluronidase】



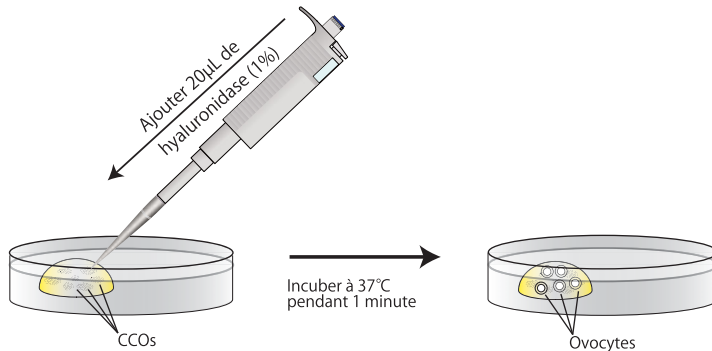
3. Placer 4 gouttes (80 µL / goutte) de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrir avec de la paraffine liquide. Placer la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 30 minutes minimum.

#### 【Boîte de rinçage】

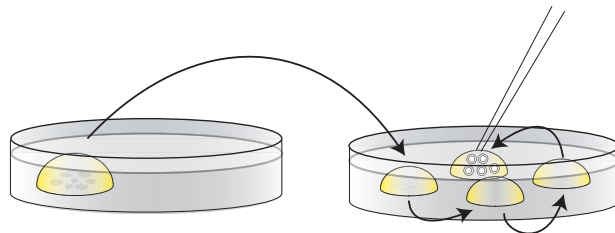


### Préparation des ovocytes dénudés

1. Collecter les complexes cumulus-ovocytes (CCOs) des femelles superovulées et introduisez-les dans une goutte de 200  $\mu\text{L}$  de mHTF (boîte contenant de la Hyaluronidase).  
(Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 6 et 9).
2. Ajouter 20  $\mu\text{L}$  de hyaluronidase (1%) à la goutte de mHTF contenant les CCOs, et placer la boîte dans l'étuve (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ) pendant 1 minute.

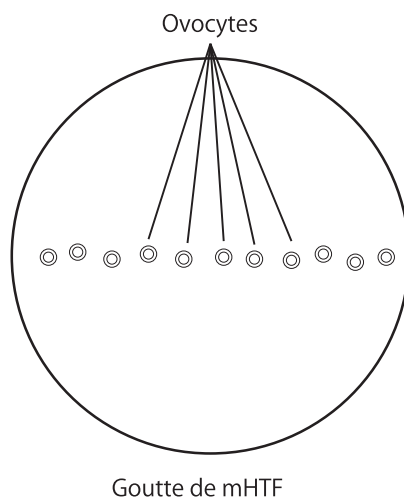


3. Transférer rapidement les ovocytes dans la première goutte de 80  $\mu\text{L}$  de mHTF (boîte de rinçage), puis rincer les ovocytes dans les gouttes successives.



### Dissection de la zone pellucide au laser

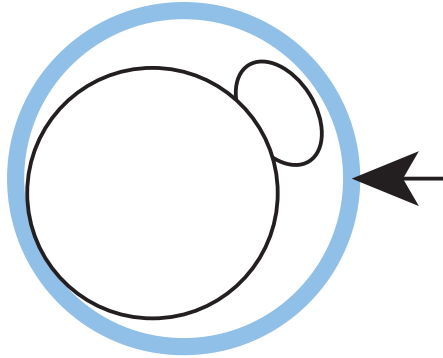
1. Placer une goutte de 100  $\mu\text{L}$  de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrir la avec de la paraffine liquide. Placer la boîte dans l'étuve (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ) au minimum 30 minutes.
2. Transférer 50 ovocytes dénudés dans une goutte de 100  $\mu\text{L}$  de mHTF.
3. Aligner les ovocytes 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.

- Placer la boîte contenant les ovocytes en position dans le système laser Saturn 3.
- 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



- 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

- 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.
- 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.

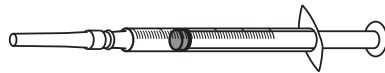
### Matériel and Equipement

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  $\mu$ L)
9. Micropipette

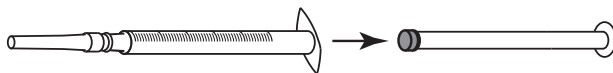
### Procédure

#### 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.

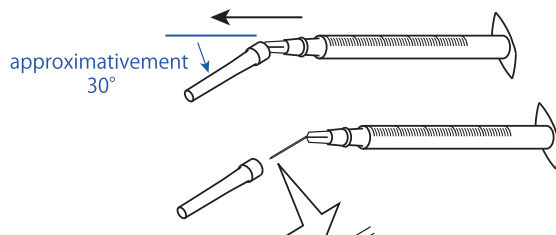


Préparer une seringue de 1 mL avec une aiguille de 30 G.

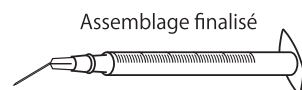


Retirez et débarrassez-vous du piston.

Retirez le capuchon de l'aiguille et servez-vous de celui-ci pour tordre l'aiguille de 30° environs.



Si vous êtes droitiers, la pointe de l'aiguille doit se retrouver en face de vous, comme indiqué sur le schéma.

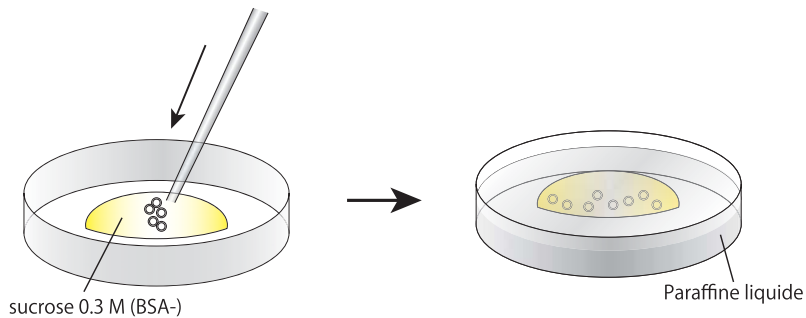


Assemblage finalisé

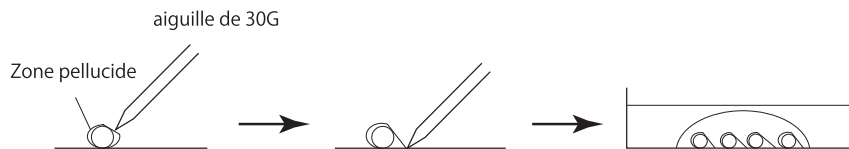



**DPZ**

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  $\mu$ L 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.

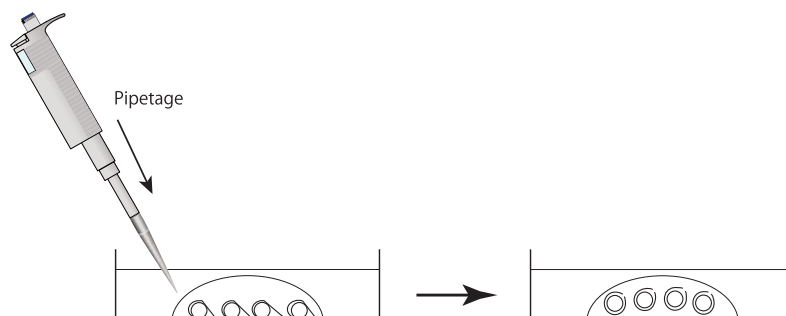


4. Sous le stéréomicroscope, disséquer partiellement la zone pellucide (DPZ) des ovocytes en exerçant un mouvement descendant unique de l'aiguille de 30 gauges.



[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  $\mu$ L 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.

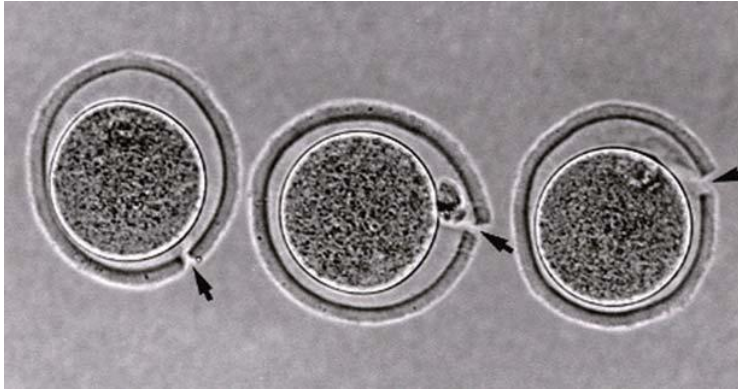
**Remarque**

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.

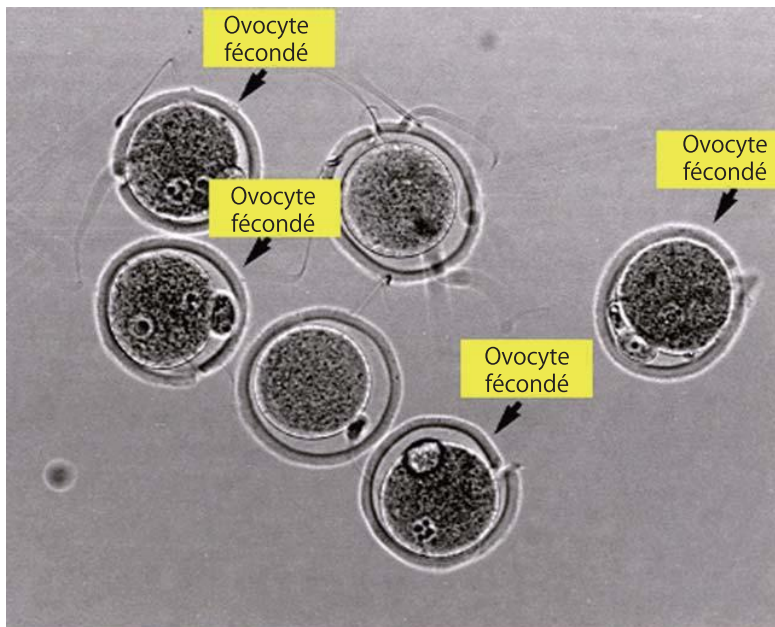
**Remarque**

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 pellucida 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

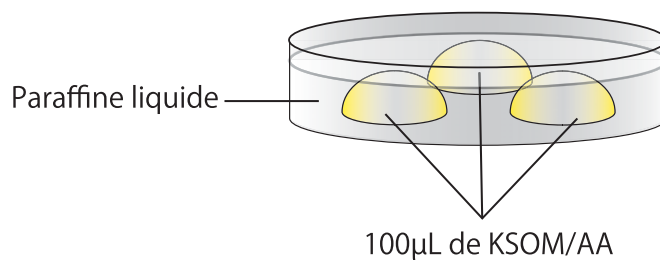
#### Superovulation et sélection des femelles synchronisées

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

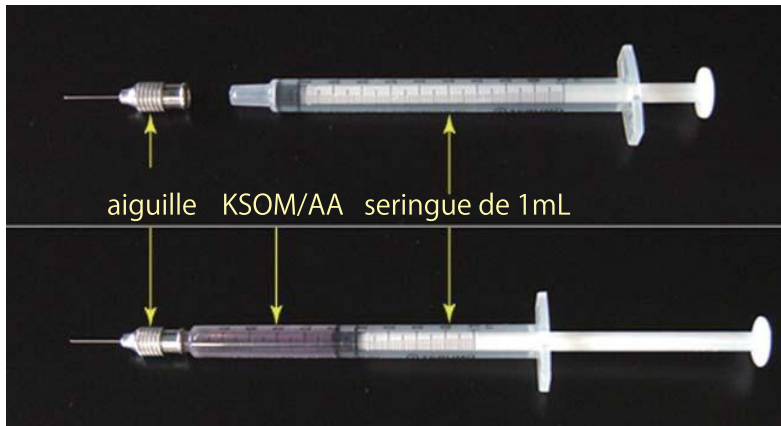
1. Placer 3 gouttes (100  $\mu$ L / goutte) de KSOM/AA dans une boîte de Pétri et recouvrir avec de la paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) au minimum 30 minutes.

【Boîte de rinçage】



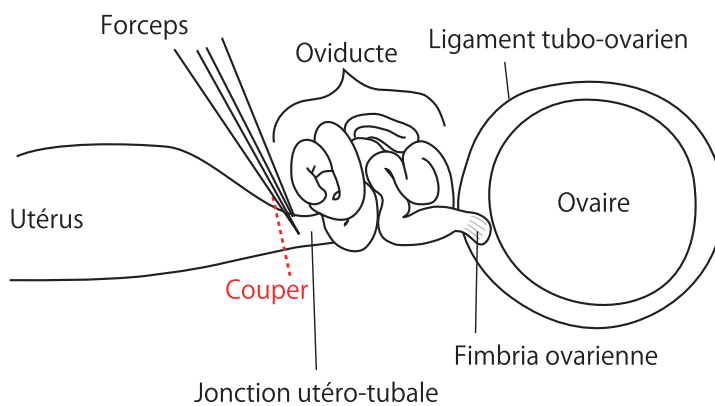
### Préparation de l'aiguille

1. Remplir une seringue de KSOM/AA et connectez-la a 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.

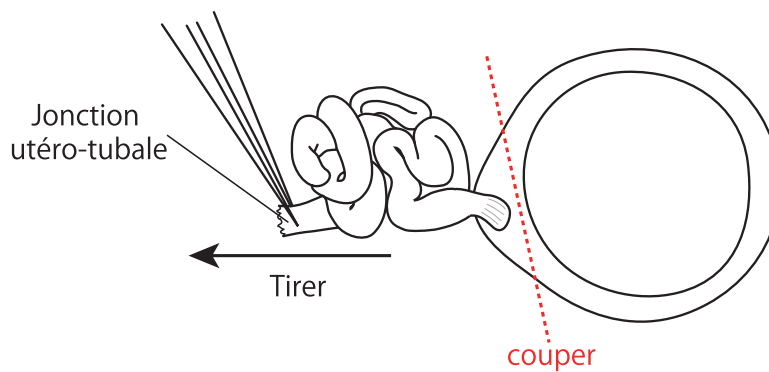


### Collection d'embryons

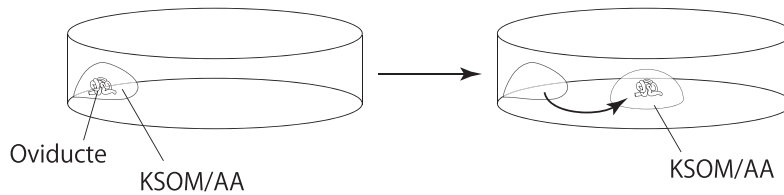
1. Le jour suivant l'identification du bouchon vaginal, disséquer les utérus, oviductes et ovaires, et placez le tout sur un papier filtre stérilisé.  
( Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 9. )
2. Immobiliser la jonction utéro-tubale et inciser du côté de l'utérus.



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

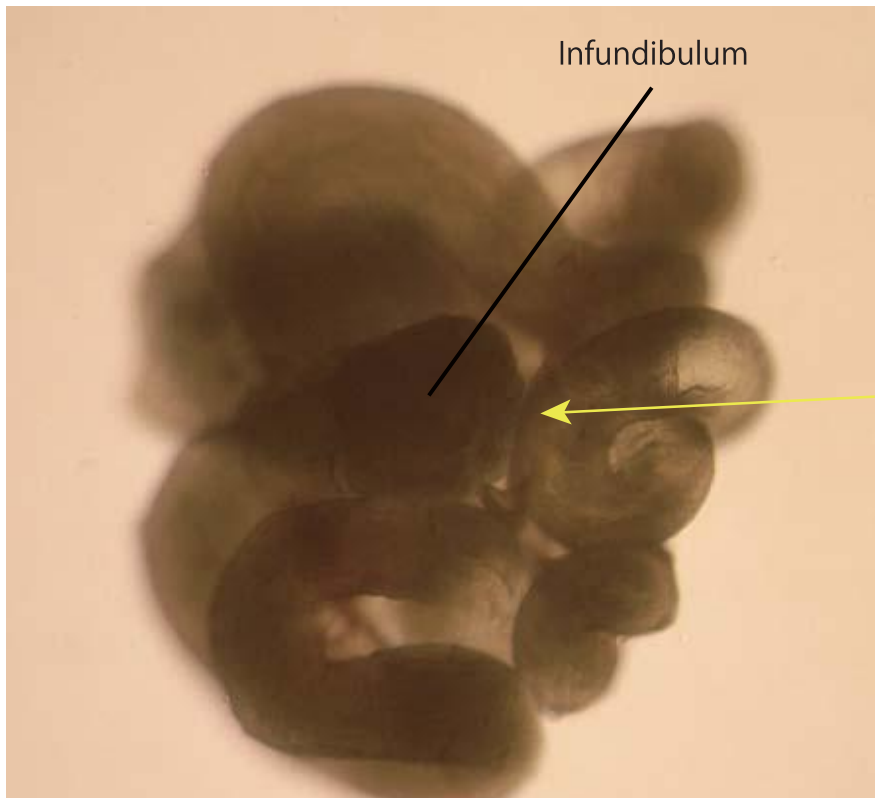


- Après avoir rincé l'oviducte dans une goutte de KSOM/AA, placer-le dans une nouvelle goutte de KSOM/AA.



- 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.

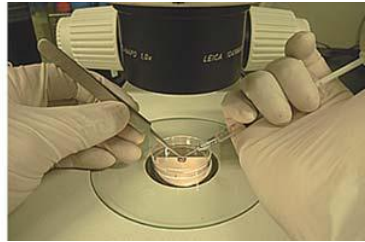
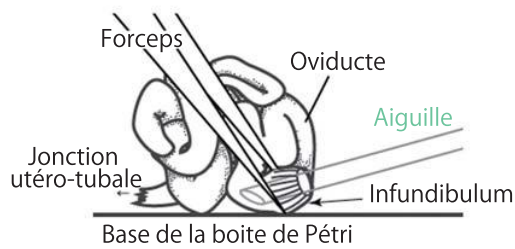
#### Remarque

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.

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

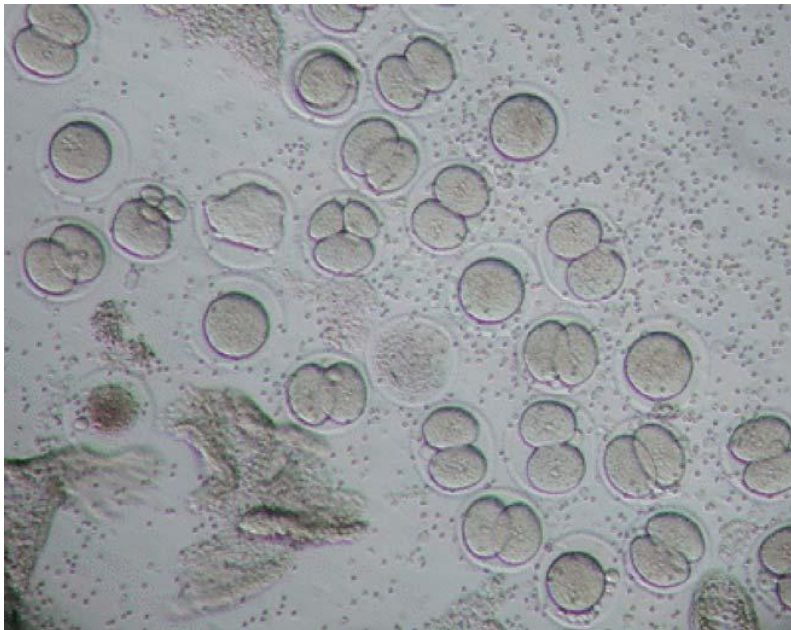


[Manipulation] No. 10-01



- 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

- 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.