

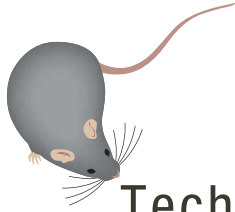
Techniques d'ingénierie reproductive de la Souris

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

5-1 Transport d'embryons au stade 2 cellules à basse température

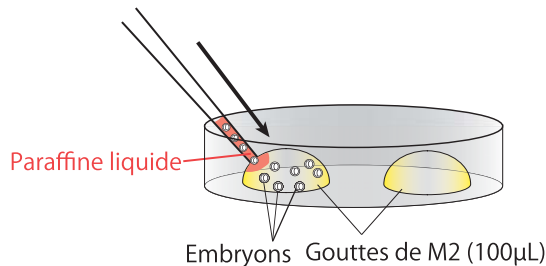
Matériel and Equipement

- Embryons au stade 2 cellules (fraichement préparés ou décongelés).
- Boîtes de Pétri en plastique (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
- Embouts pour dépôt sur gel (Cat. No. 010-R204S; Bio Medical Instrument)
- M2 (Cat. No. M7167; Sigma)
- Tube de 0.5mL (Microtubes 0.5mL Fisherbrand Flip Cap; Fisher Scientific Cat. No. FS-MCT-060 -C)
- Pipettes de transfert
- KSOM/AA
- Paraffine liquide
- Moniteur de température (Thermochron iButton Cat. No. DS1921G; Maxim Integrated Products)
- 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 supporter un tube de 0.5 mL)
 - Coton
 - Blocs réfrigérants (petits et grands)
 - Boîte de transport en polystyrène (Cat. No. KC-3, KARUX)

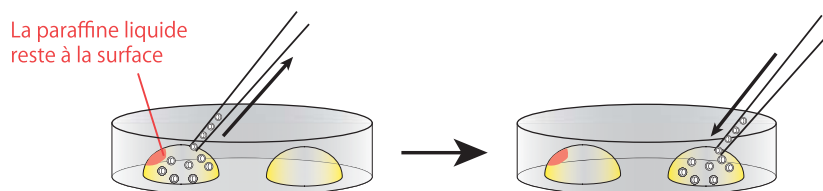
Procédure

Stockage réfrigéré d'embryons au stade 2 cellules

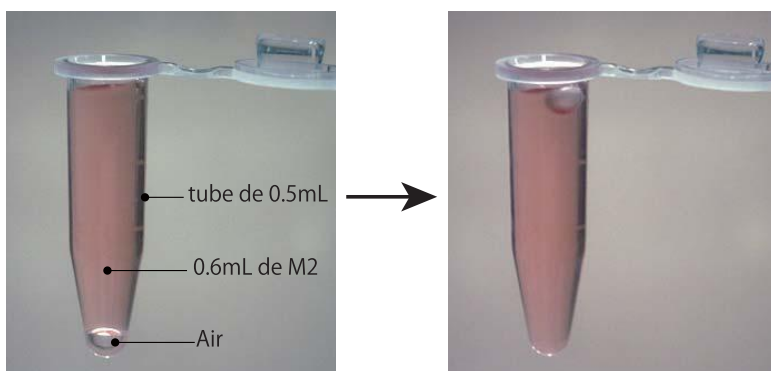
- Placer deux gouttes de 100 μ L de M2 dans une boîte de Pétri.
- Transférer les embryons au stade 2 cellules du milieu de culture à la goutte de M2.



- Monter un nouveau capillaire à l'aspirateur buccal et aspirer les embryons dans ce nouveau capillaire, en évitant de toucher la paraffine liquide restée sur la goutte de M2. Transférer les embryons dans la goutte de M2 préalablement préparée à l'étape 1.



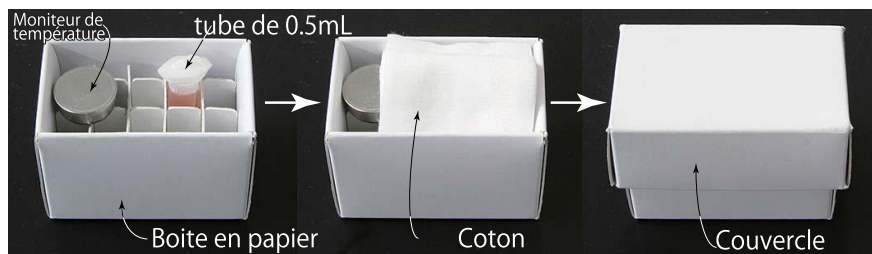
- Remplissez un tube de 0.5 mL avec 0.6 mL de M2 à température ambiante. Si vous observez la présence de bulles au fond du tube, tapoter le tube pour évacuer les bulles.



- Déposer les embryons au fond du tube (40 embryons/tube).



- Placer le tube contenant les embryons, le moniteur de température, et un morceau de coton dans la boîte en papier.



- Placer la boîte en papier dans le réfrigérateur (4-8°C).

Remarque

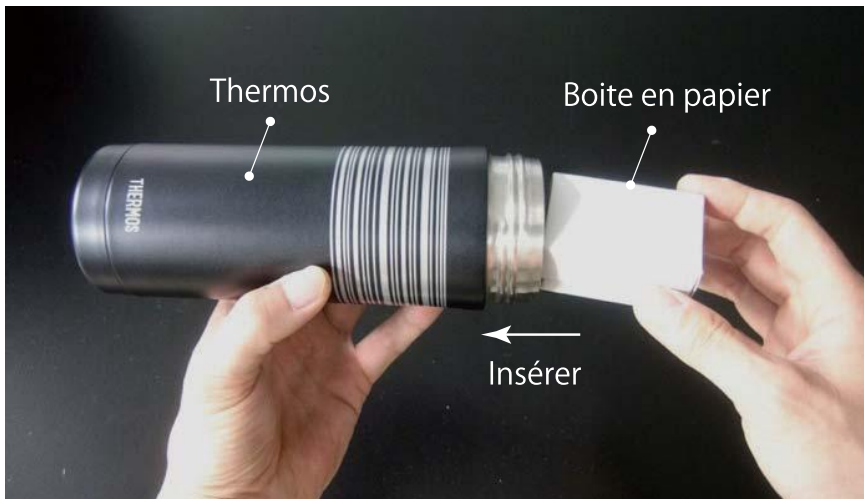
Les embryons maintiennent leurs capacités développementales pendant 72 heures.

Emballage et transport d'embryons au stade 2 cellules

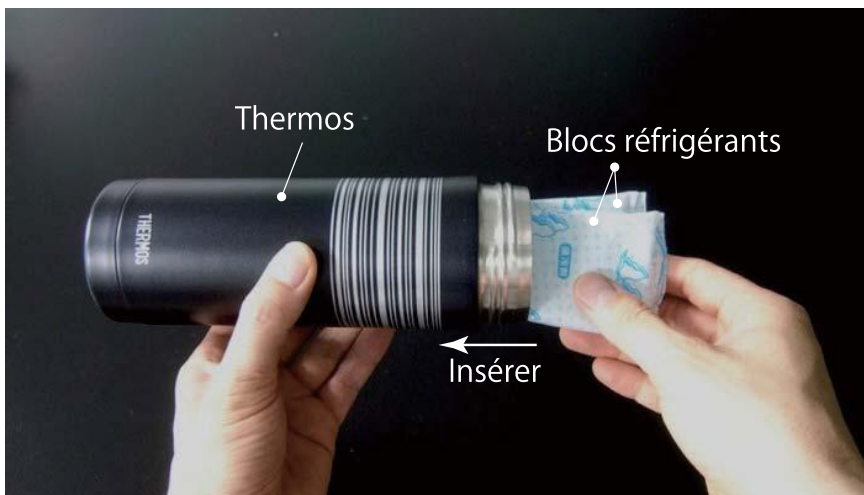
Préparez une boîte en papier contenant les embryons au stade 2 cellules comme détaillé précédemment (Stockage réfrigéré d'embryons au stade 2 cellules).

Les grands blocs réfrigérants et la boîte en polystyrène doivent être refroidis au préalable (4-8°C) avant utilisation. Ceci n'est pas nécessaire pour les petits blocs réfrigérants et le thermos.

1. Placer la boîte en papier contenant les embryons dans le thermos.



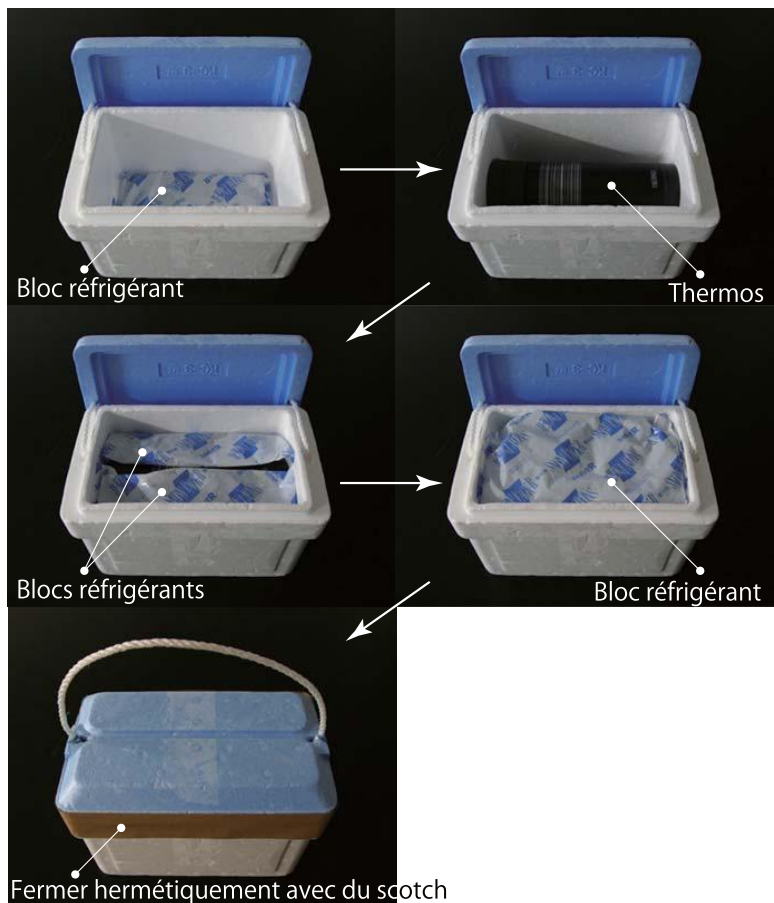
2. Insérer deux petits blocs réfrigérants dans le thermos.



3. Visser le bouchon du thermos.



- Placer un grand bloc réfrigérant au fond de la boîte en polystyrène et allonger le thermos dessus.
- Placer un grand bloc réfrigérant de chaque côté du thermos, puis un dernier par-dessus avant de fermer le couvercle.
- Fermer hermétiquement à l'aide de scotch.



- Garder la boîte de transport au réfrigérateur jusqu'à la prise en charge par le service postal.
- Expédier les échantillons par voie postale traditionnelle.

Note

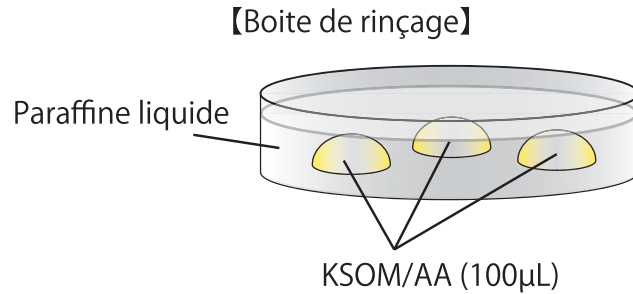
Prenez soin de ne pas retourner la boîte en papier.

Note

Il n'est pas possible de placer le thermos tout au fond de la boîte de transport. Les dimensions du thermos ne lui permettent que d'être placé au centre de la boîte. Ce design est intentionnel afin d'optimiser la protection du thermos lors du transport.

Collection des embryons au stade 2 cellules à l'arrivée de la boîte de Transport.

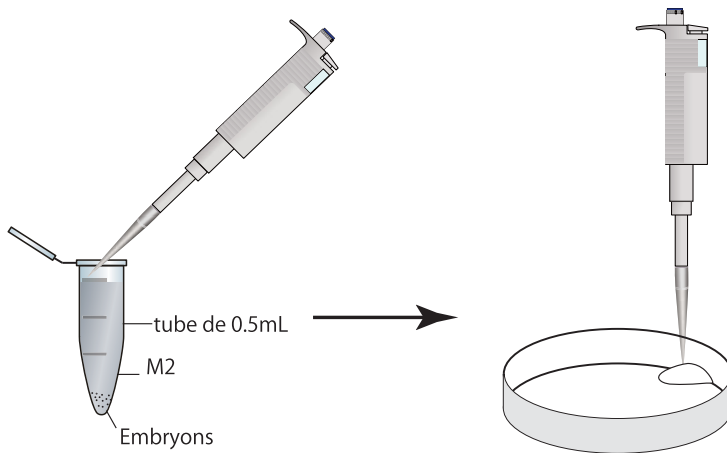
1. Placer 3 gouttes (100 μ L / goutte) de KSOM/AA dans une boîte de Pétri et recouvrir avec de la paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) au minimum 30 minutes.



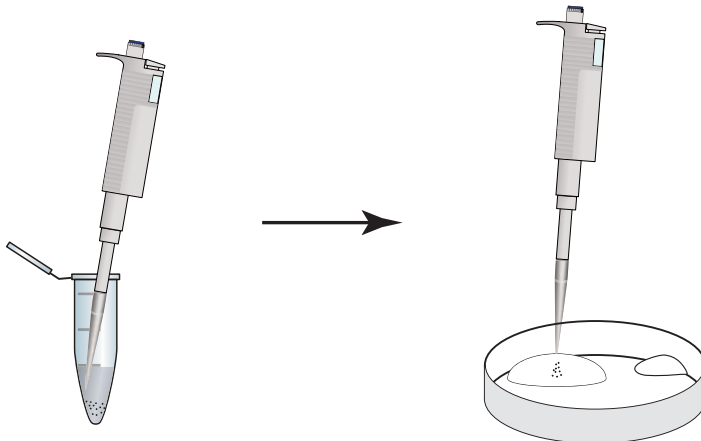
2. Sortir la boîte en papier contenant les échantillons du thermos.
3. Laisser la boîte en papier à température ambiante pendant 30 minutes.

【Réceptionner les échantillons】 No. 11-01

4. Ouvrir la boîte en papier et retirer le coton avec précaution. Saisissez le tube contenant les embryons et ouvrez-le.
5. Prélever 200 μ L de M2 de la phase supérieure en utilisant un embout pour dépôt sur gel, puis déposer le M2 sur le bord de la boîte de Pétri.



6. Prélever avec précaution le reste de M2 avec un embout pour dépôt sur gel, puis déposer le M2 sur au centre de la boîte de Pétri.

**Note**

Les embryons doivent être maintenus réfrigérés pendant toute la durée du transport. Assurez-vous que ces conditions soient remplies auprès du service postal.

Remarque

Les embryons maintiennent leurs capacités développementales pendant 72 heures.

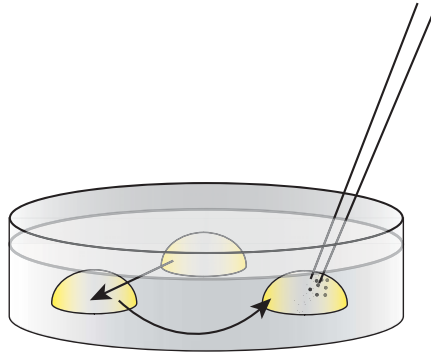
Remarque

Ce temps de repos de 30 minutes permet de s'assurer que les embryons reposent au fond du tube.

Note

Prenez soin de ne pas aspirer de bulles d'air dans l'embout pour dépôt sur gel.

7. Prélever les embryons du M2, et transférer-les successivement dans les trois gouttes de 100 μL de KSOM/AA pour les rincer.



8. Transférer les embryons dans l'oviducte d'une souris en pseudogestation.

Références

1. Takeo T., Kaneko T., Haruguchi Y., Fukumoto K., Machida H., Koga M., Nakagawa Y., Takeshita Y., Matsuguma T., Tsuchiyama S., Shimizu N., Hasegawa T., Goto M., Miyachi H., Anzai M., Nakatsukasa E., Nomaru K., and Nakagata N. 2009. Birth of mice from vitrified/warmed 2-cell embryos transported at a cold temperature. *Cryobiology*. 58(2): 196-202.
2. Takeo T., Kondo T., Haruguchi Y., Fukumoto K., Nakagawa Y., Takeshita Y., Nakamura Y., Tsuchiyama S., Shimizu N., Hasegawa T., Goto M., Miyachi H., Anzai M., Fujikawa R., Nomaru K., Kaneko T., Itagaki Y., and Nakagata N. 2010. Short-term storage and transport at cold temperatures of 2-cell mouse embryos produced by cryopreserved sperm. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 49(4): 415-419.

Note

Si quelques embryons sont restés dans le tube après transfert, rincer les parois internes du tube avec 200 μL de M2.

Remarque

Dans l'idéale, la réimplantation des embryons sur les souris pseudogestatives doit être effectuée immédiatement à l'arrivée.

5-2 Transport d'oviductes contenant des embryons au stade 2 cellules à basse température (0°C)

Matériel and Equipement

1. Sucrose 0.8 M
2. PB1
3. KSOM/AA
4. Sachet en plastique
5. Thermos
6. Glace pilée
7. Cryotubes à fond conique (Cat. No. 366656; NUNC)
8. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)

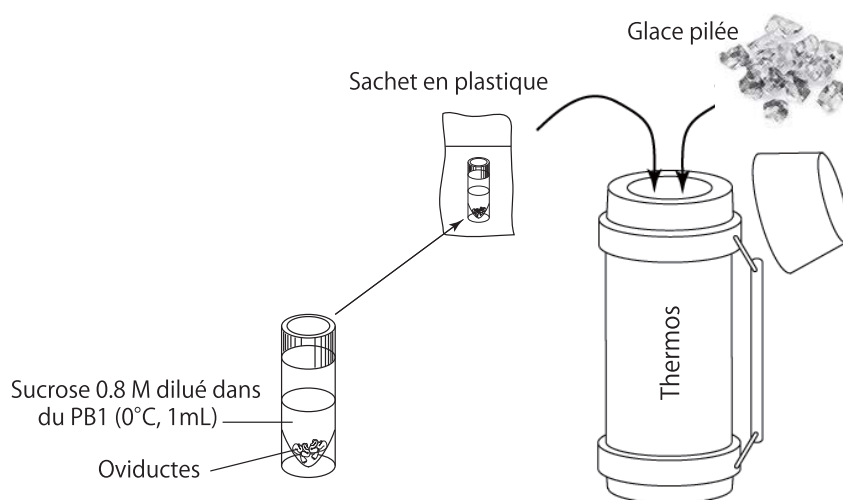
Procédure

Dissection des oviductes de femelles superovulées avec bouchons vaginaux

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 matin (jusqu'à midi), examiner les femelles pour identifier celles présentant un bouchon vaginal (Reportez-vous au chapitre Réimplantation d'embryons par l'oviducte en page 66).
4. Sacrifier les femelles sélectionnées 44 à 46 heures après l'injection de hCG.
5. Disséquer les oviductes des femelles et transférez-les dans une goutte de sucrose à 0°C (100-200 μ L – 0.8 M). (Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 9).

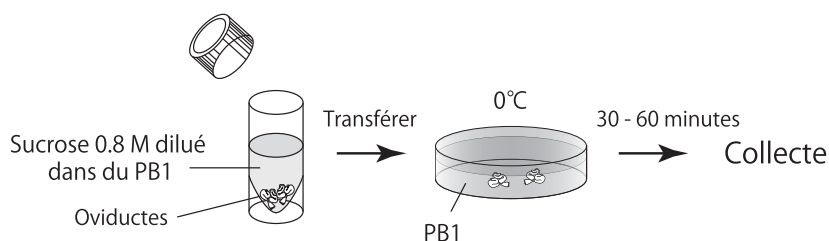
Transport des oviductes

1. Transférer les oviductes dans un cryotube contenant 1 mL de sucrose 0.8 M (0°C).
2. Placer le tube dans un sachet en plastique et fermer hermétiquement.
3. Placer le sachet en plastique dans le thermos contenant la glace pilée et expédier le tout par service postal.



Réception des embryons

1. Retirer le tube du thermos.
2. Collecter les oviductes et placer-les dans la solution de PB1 (0°C) pendant 30 à 60 minutes.
3. Rincer les oviductes avec du PB1 (0°C). (Reportez-vous au chapitre Collecte d'Embryons au stade 2 cellules en page 42.)
4. Rincer les embryons dans 3 cycles successifs de KSOM/AA (37°C) fraîchement préparé.



Références

1. Kamimura E., Nakashima T., Ogawa M., Ohwada K., and Nakagata N. 2003. Study of low-temperature (4°C) transport of mouse two-cell embryos enclosed in oviducts. *Comp. Med.* 53: 393-396.
2. Ogawa M., Fuchiwaki M., Valdez Jr. Delgado M., Yanagita T., Ide Y., Fukumoto K., Machida H., Kawabe T., Kaneko T., Kasai M., and Nakagata N. 2005. Development after freeze-thawing of mouse embryos collected from oviducts transported at 0°C. *Exp. Anim.* 54(3) Suppl: 242.

Note

Les embryons dégénèrent rapidement si l'étape 2 est omise.

Note

Les oviductes ne doivent pas être maintenus dans le tube au-delà de 48 heures, auquel cas les embryons dégénèrent.

Les embryons doivent être transportés congelés s'ils ne sont pas utilisés immédiatement à l'arrivée.

(Reportez-vous au chapitre Vitriification simple d'embryons murins en page 54).