

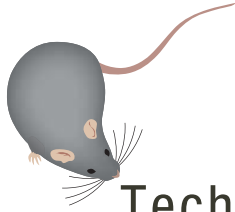
Techniques d'ingénierie reproductive de la Souris

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

6-1 Simple vitrification d'embryons murins

Matériel and Equipement

1. DMSO 1 M
2. DAP213
3. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
4. Microfiltre (Millex-GV 0.22 μm Cat. No. SLGV013SL; MILLIPORE)
5. Embouts pour dépôt sur gel (MBP Gel 200, Cat. No. 3621; Molecular BioProducts)
6. Pipettes de transfert
7. Cryotubes (Cryogenic Vials Cat. No. MS-4501W; Sumitomo Bakelite, Japan - alternative : Cat. No. 366656; NUNC.)
8. Micropipette
9. Porte-tubes
10. Bloc réfrigérant Nalgene (Cat. No. 5115-0012; NALGENE, USA)
11. Azote liquide
12. Microscope
13. Sucrose 0.25 M
14. KSOM/AA
15. Paraffine liquide

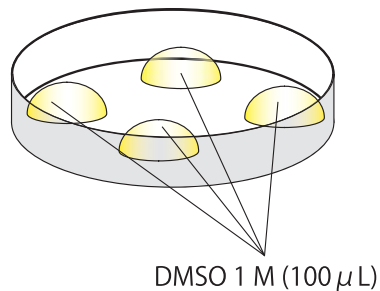
Procédure

Préparation du bloc réfrigérant et des cryotubes

1. La veille de la vitrification placer le bloc réfrigérant (Cat. No. 5115-0012; NALGENE, USA) au congélateur à -20°C .
2. Retirer le bloc réfrigérant du congélateur dix minutes environ avant de commencer la vitrification.
3. Placer les cryotubes dans le bloc réfrigérant. Pour calculer le nombre de cryotubes nécessaires, considérez que chaque cryotube contienne environ 40 embryons.
4. Juste avant de commencer la procédure, vérifier que la température dans les tubes est bien 0°C .

Vitrification

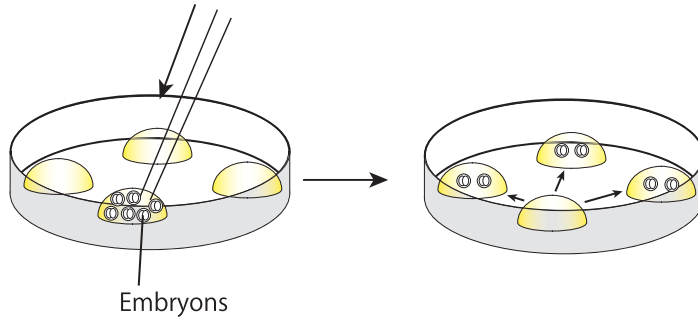
1. Filtrer le DMSO 1 M et disposez 4 gouttes ($\sim 100 \mu\text{L}$ / goutte) dans une boîte de Pétri. La première goutte sert à rincer les embryons, alors que les autres gouttes servent à contenir les embryons préalablement rincés.



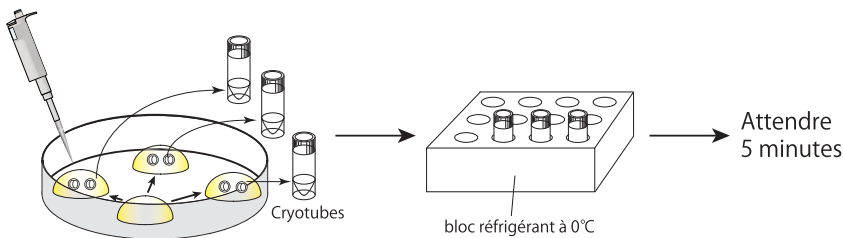
Remarque

Le bloc réfrigérant peut être substitué par de la glace pilée.

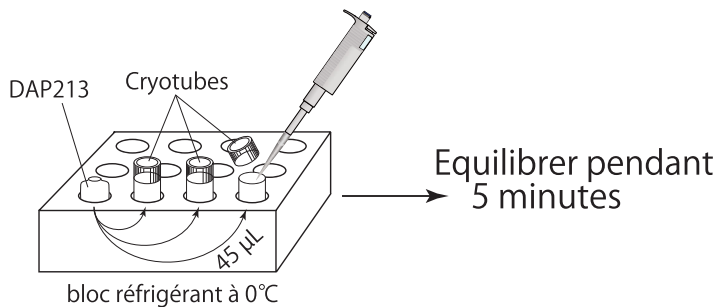
2. Déposer les embryons dans la première goutte pour les rincer du milieu de collection. Diviser le total en lots égaux et transférer les embryons dans les gouttes respectives. Par exemple, si vous disposez de 120 embryons dans la goutte de rinçage, séparez-les en groupes de 40 dans les trois autres gouttes. Ces échantillons seront ensuite placés dans les cryotubes pour être vitrifiés.



3. Monter un embout pour dépôt sur gel sur une pipette de 20 μL et pipeter les embryons dans un volume total de 5 μL de DMSO 1 M. Déposer les embryons dans un cryotube et placer le tube dans le bloc réfrigérant à 0°C pendant 5 minutes.



4. Ajouter 45 μL d'agent cryoprotecteur (DAP213) à 0°C dans le cryotube et équilibrez le tout pendant 5 minutes dans le bloc réfrigérant.



Note

Maintenir les cryotubes dans le bloc réfrigérant pour plus de 5 minutes n'est pas un problème (<20 minutes).

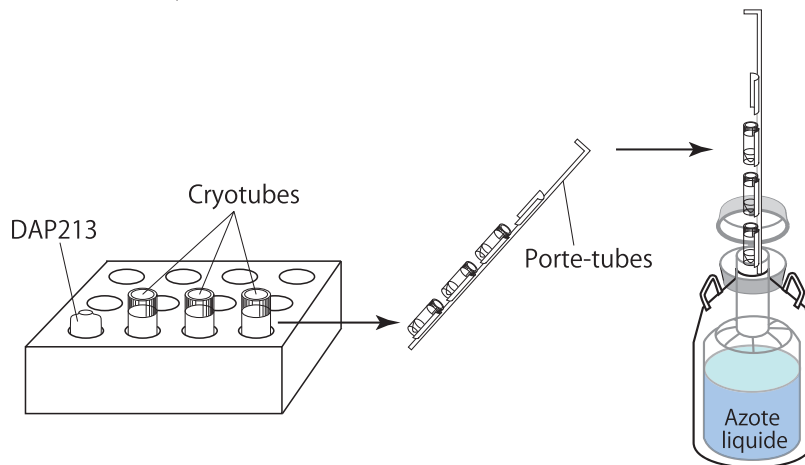
Note

Il est recommandé de regrouper les embryons au centre de la goutte pour faciliter le pipetage dans un volume limité à 5 μL de DMSO 1 M.

Note

Prenez garde de ne pas trop visser le bouchon après avoir ajouté le DAP213, sans quoi il risque d'être difficile de le dévisser rapidement pour raviver les embryons.

- Placer les cryotubes rapidement sur le porte-tubes et immerger les tubes directement dans l'azote liquide.

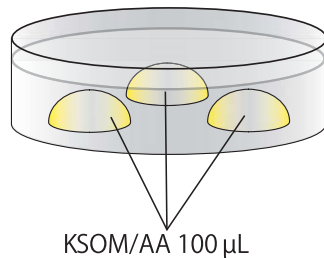


[Vitrification des Embryons] No. 13-01 

Préparation pour la décongélation

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

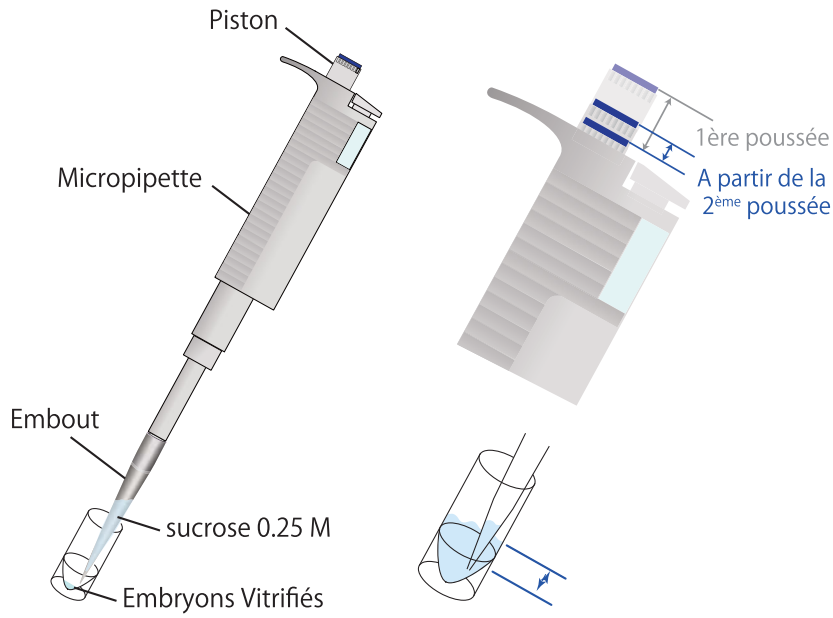
【Boîte de rinçage】



- Préchauffer la solution de sucrose 0.25 M dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) avant de l'utiliser.

Raviver les embryons congelés

- Retirer un cryotube de l'azote liquide et ouvrir le bouchon. Vider l'azote liquide restant dans le tube et laisser le tube se réchauffer à température ambiante pendant 30 secondes.
- Ajouter 0.9 mL de sucrose 0.25 M (préchauffé à 37°C) dans le cryotube et pipeter plusieurs fois pour réchauffer l'échantillon. Lors du pipetage, prenez soin de ne pas trop créer de bulles ou d'endommager les embryons. Transférer le contenu du cryotube dans une boîte de Pétri.



L'embout ne doit pas toucher le fond du cryotube, sinon la solution de sucrose 0.25 M congèle immédiatement et il devient impossible de la pipeter.

Pressez une première fois sur le piston jusqu'à la deuxième butée pour libérer le volume entier (0.9 mL) de sucrose 0.25 M. Subséquemment, pressez sur le piston une dizaine de fois jusqu'à la première butée pour ne déplacer qu'un petit volume de sucrose 0.25 M. Ceci permet d'éviter la formation de bulles dans le sucrose 0.25 M.

- Ajouter 0.4-0.5 mL de sucrose 0.25 M dans le cryotube and transférer à nouveau le contenu dans la boîte de Pétri. Cette opération permet de diluer l'agent cryoprotecteur et sert aussi à récupérer les derniers embryons restés dans le tube.

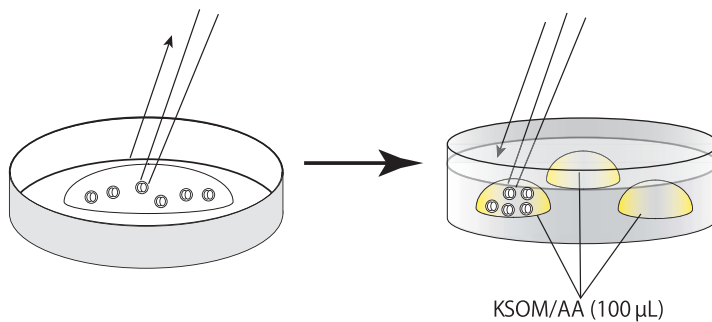
[Raviver les Embryons Vitrififiés]

No. 13-02

[Pipetage pour Raviver les Embryons Vitrififiés]

No. 13-03

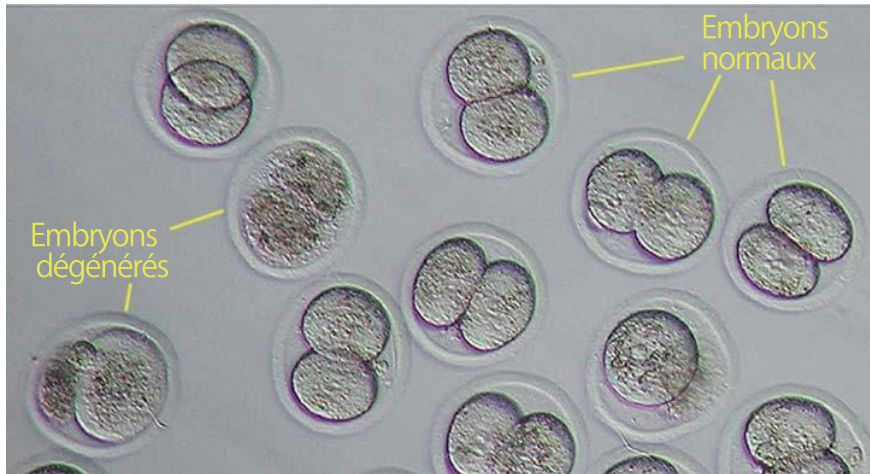
- Aspirer les embryons et transférer-les dans une goutte de KSOM/AA (boîte de rinçage) puis placer la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO₂).



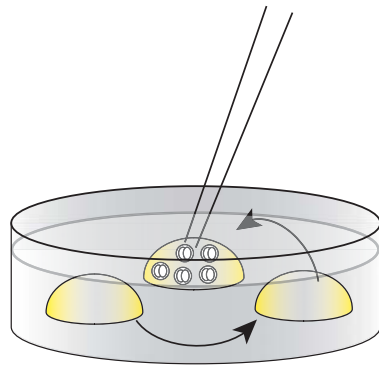
Note

Il est très important de réchauffer l'échantillon le plus rapidement possible pour éviter que l'agent cryoprotecteur (DAP213) devienne toxique pour les embryons.

[Micrographe : Embryons Ravivés après Vitrification]



5. Au bout de 10 minutes, rincer les embryons dans 2 cycles successifs de KSOM/AA (37°C) fraîchement préparé.



Références

1. Nakagata N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fert.* **87**: 479-483.
2. Nakagata N. 1993. Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by *in vitro* fertilization between cryopreserved gametes. *J. Reprod. Fert.* **99**: 77-80.
3. Nakagata N. 1995. Studies on cryopreservation of embryos and gametes in mice. *Exp. Anim.* **44**: 1-8.
4. Nakao K., Nakagata N., and Katsuki M. 1997. Simple and efficient procedure for cryopreservation of mouse embryos by simple vitrification. *Exp. Anim.* **46**: 231-234.

6-2 Simple vitrification d'ovocytes murins

Matériel and Equipement

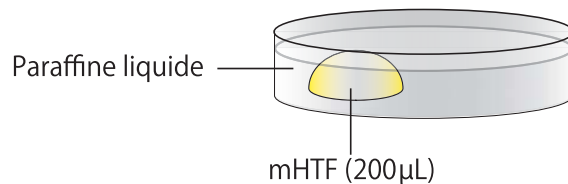
1. Souris femelles superovulées avec PMSG et hCG
2. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
3. Paraffine liquide
4. Micropipette
5. Embouts de pipettes
6. mHTF
7. Hyaluronidase (1%) diluée dans du mHTF
8. Sérum foetal de bœuf (FBS Cat. No. 26140-087; Gibco)
9. Microfiltre (Millex-GV 0.22 μm Cat. No. SLGV013SL; MILLIPORE)
10. Capillaires en verre pour manipuler les embryons
11. Etuve humidifiée (37°C, 5% CO_2)
12. Matériel et équipement utilisés pour la vitrification et la décongélation des embryons (Reportez-vous aux chapitre Vitrification simple d'embryons murins en page 54).

Procédure

Préparation des boîtes de Pétri

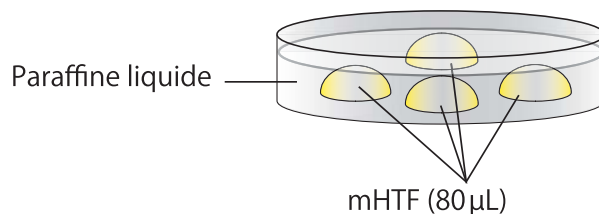
1. Placer 1 goutte de 200 μL de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrez-la de paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO_2) au minimum 30 minutes.

【Boîte contenant les Ovocytes】



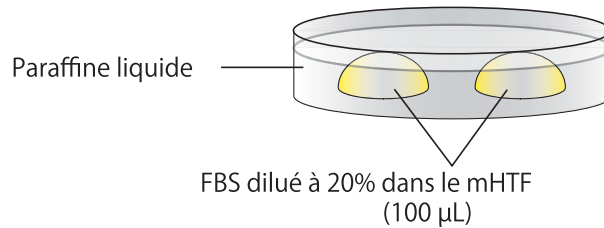
2. Placer 4 gouttes (80 μL /goutte) de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrez-les de paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO_2) au minimum 30 minutes.

【Boîte de rinçage】



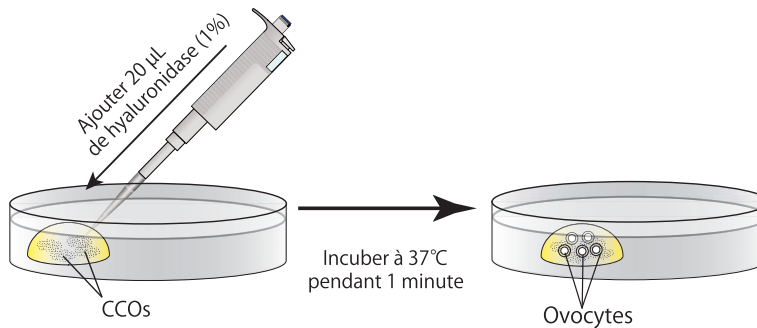
- Diluer le sérum fœtal de boeuf (FBS) à 20% dans le mHTF et stérilisez par filtration. Placer 2 gouttes (100 μ L /goutte) de ce milieu dans une boîte de Pétri et recouvrez-les de paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) au minimum 30 minutes.

【Boîte contenant du FBS】

**Préparation des ovocytes dénudés**

- Collecter les complexes cumulus-ovocytes (CCOs) des oviductes de femelles superovulées et placer-les dans la goutte de 200 μ L de mHTF (boîte contenant les ovocytes).
- Ajouter 20 μ L de hyaluronidase (1%) à la goutte de mHTF contenant les CCOs et placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) pendant 1 minute.

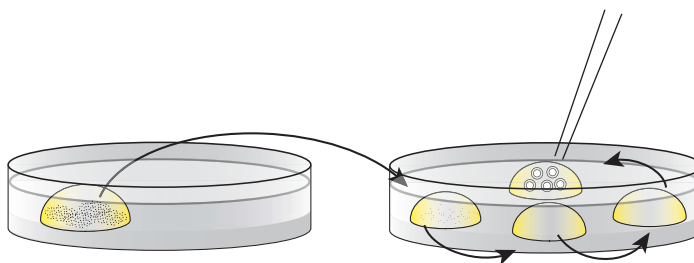
【Boîte contenant les ovocytes】



- Collecter et transférer rapidement les ovocytes dans la première goutte de 80 μ L de mHTF (boîte de rinçage), puis transférer les ovocytes dans les 3 autres gouttes.

【Boîte contenant les ovocytes】

【Boîte de rinçage】

**Note**

Assurez-vous d'effectuer toutes les opérations, depuis l'abattage des femelles et la collecte des oviductes jusqu'à l'immersion des CCOs dans la goutte de mHTF en un minimum de temps (30 secondes maximum).

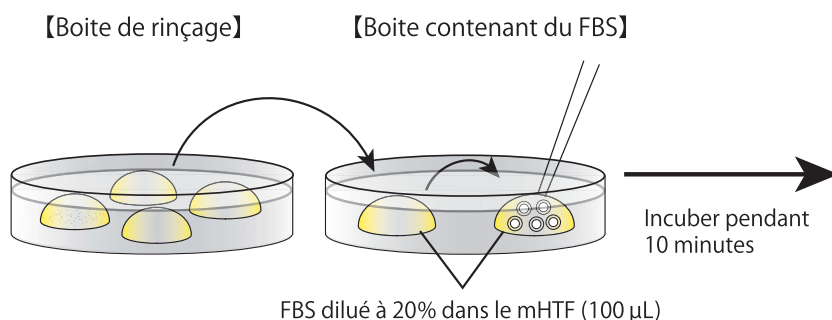
Si vous effectuez la procédure sans assistance, assurez-vous de ne pas sacrifier plusieurs souris à la fois. Il est préférable de n'abattre qu'une souris et prélever ses oviductes rapidement avant de procéder à la dissection de la souris suivante.

Remarque

Si les cellules folliculaires collent à la zone pellucide, celles-ci peuvent être décollées par simple trituration avec la pipette en verre.

Culture des ovocytes dans une goutte contenant du FBS

1. Placer les ovocytes dans la première goutte de FBS pour les rincer, puis les transférer dans la deuxième goutte où ils seront incubés 10 minutes dans l'étuve (37°C, 5% CO₂).



Remarque

Le FBS joue un rôle de prévention du durcissement de la zone pel- lucide durant la vitrification et la décongélation.

Simple vitrification d'ovocytes murins

1. Les ovocytes peuvent être vitrifiés en utilisant la méthode de simple vitrification. Toutefois il est nécessaire de se débarrasser au préalable des cellules folliculaires et de placer les ovocytes en culture dans une goutte contenant du FBS. En outre, la méthode de décongélation est similaire à celle utilisée pour les embryons (Reportez-vous au chapitre Vitrification rapide d'embryons murins en page 54).

Fécondation *In Vitro* à partir d'ovocytes congelés

1. Les ovocytes vitrifiés peuvent être utilisés pour effectuer une fécondation *in vitro* à partir de sperme frais, transporté à basse température, ou même congelé.
2. (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

1. Nakagata N., Takeo T., Fukumoto K., Kondo T., Haruguchi Y., Takeshita Y., Nakamuta Y., Matsunaga H., Tsuchiyama S., Ishizuka Y., Araki K. 2013. Applications of cryopreserved unfertilized mouse oocytes for *in vitro* fertilization. *Cryobiology*. 67(2):188-92.

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.

6-3 Vitrification et transplantation d'ovaires

Matériel and Equipement

1. Boîtes de Pétri de 35mm stériles
2. mWM
3. Donneuse : souris femelle (âgée de 1 jour à 30 semaines)
4. Receveuse : souris femelle âgée de 4 semaines et de lignée histocompatible avec l'ovaire à transplanter).
5. Anesthésiants
6. Micro-ciseaux à ressorts (lame de 5mm)
7. Une paire de forceps watchmaker's #5
8. Agrafes de suture (Autoclip 9mm; Clay Adams 427631) et applicateur d'agrafes (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams 427630)
9. Plaque chauffante (37°C)

Procédure

Dissection des ovaires

1. Sacrifiez la femelle donneuse et disséquez ses ovaires (Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 9).
2. Placez les ovaires dans une boîte contenant suffisamment de mWM.

Vitrification

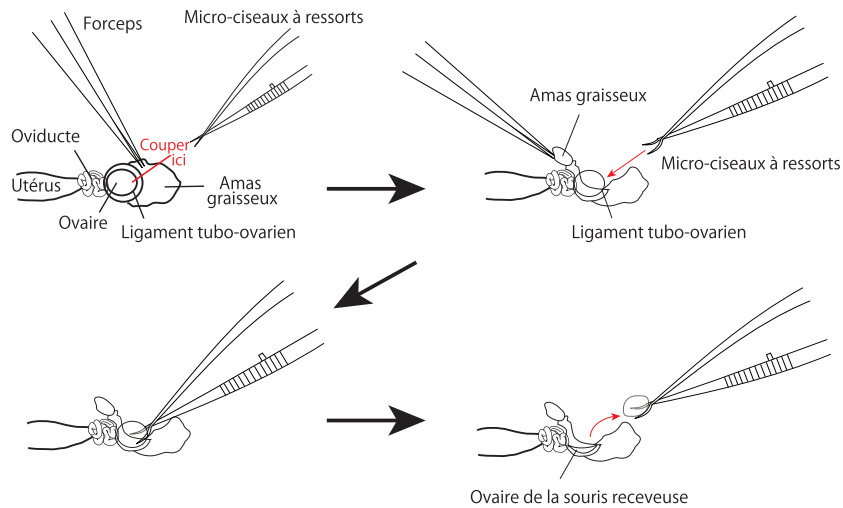
1. Les ovaires sont vitrifiés en utilisant la même méthode que pour les embryons (Reportez-vous au chapitre Vitrification simple d'embryons murins en page 54).

Transplantation

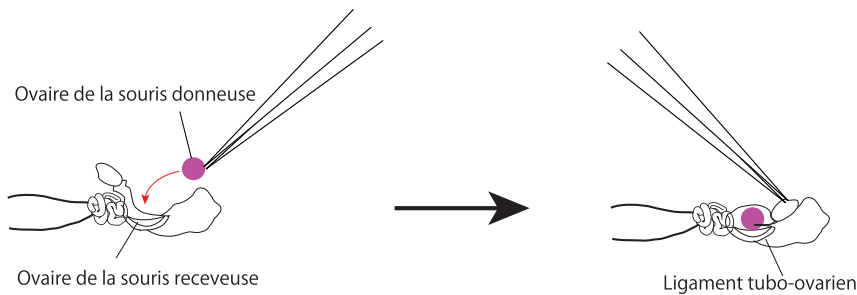
1. Anesthésiez la femelle receveuse.
2. Saisir l'appareil reproducteur (ovaire, oviducte et corne utérine) de manière conventionnelle (Reportez-vous au chapitre Réimplantation d'embryons par l'oviducte en page 67).
3. A l'aide de micro-ciseaux inciser approximativement 1/4 du ligament tubo-ovarien, ainsi qu'une partie de l'amas de graisse adjacent.
4. Retirer 1/2 - 2/3 de l'ovaire avec les micro-ciseaux (à lame courbée).

Remarque

Le fait que les micro-ciseaux soient courbés facilite la mise en place de l'ovaire donneuse.



5. Insérer l'ovaire de la femelle donneuse en lieu et place de l'ovaire retirée et recouvrez-la avec le ligament tubo-ovarien.



[Transplantation d'ovaire de la souris] No. 15-01 

6. Repositionner l'appareil reproducteur dans l'abdomen et refermer l'incision avec des clips de suture.
7. Répéter l'opération pour le second ovaire.
8. Maintenez la température corporelle de la souris (37°C) en la plaçant sur la plaque chauffante jusqu'à ce que les effets de l'anesthésie aient complètement disparu.

Références

1. Migishima F., Suzuki-Migishima R., Song S.Y., Kuramochi T., Azuma S., Nishijima M., and Yokoyama M. 2003. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol. Reprod.* **68**: 881-887.
2. Tsuchiyama S., and Nakagata N. 2009. Cryopreservation of ovaries from elderly female mice. *Exp. Anim.* **58**(3) Suppl: 248.