

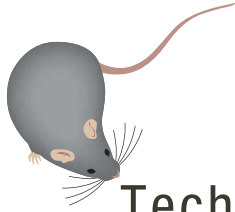
Techniques d'ingénierie reproductrice de la **Souris**

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

7-2 Réimplantation d'embryons par l'oviducte

Dans notre laboratoire, nous avons mis au point une technique de réimplantation d'embryons au stade 2 cellules au travers de la paroi de l'oviducte.

Cette procédure est bien plus simple et facile à exécuter que la méthode traditionnelle par l'infundibulum. Cette méthode est donc idéale lorsque le personnel technique ne possède que peu d'expérience.

Matériel and Equipement

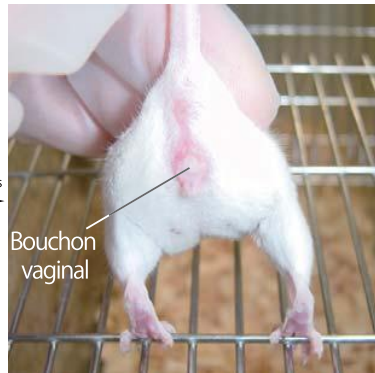
1. Souris femelles au premier jour de pseudogestation (avec un bouchon vaginal)

[Apparence du vagin en proestrus]



Accoupler avec les
males vasectomisés

[Bouchon vaginal]

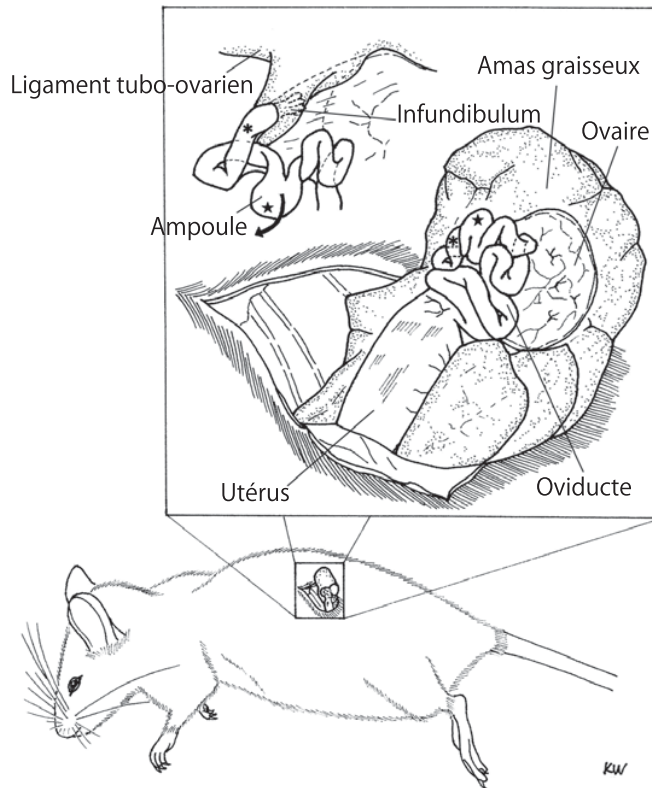


2. Anesthésiants
3. Micro-ciseaux à ressorts (lame de 5mm)
4. Une paire de forceps watchmaker's #5
5. Clamp (Serrefine)
6. Agrafes de suture (Autoclip 9mm; Clay Adams 427631) et applicateur d'agrafes (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams 427630)
7. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
8. Capillaires en verre pour manipuler et réimplanter les embryons
9. Plaque chauffante (37°C)

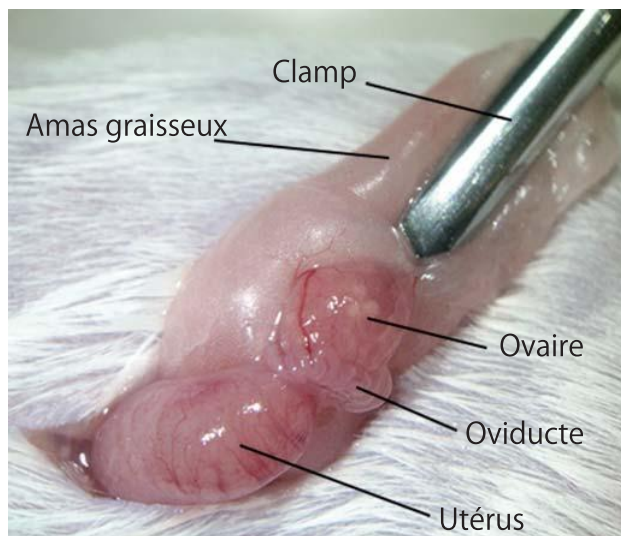
Procédure

Préparation des souris

1. Anesthésier une souris femelle.
2. Disséquer l'appareil reproducteur (ovaire, oviducte et corne utérine).

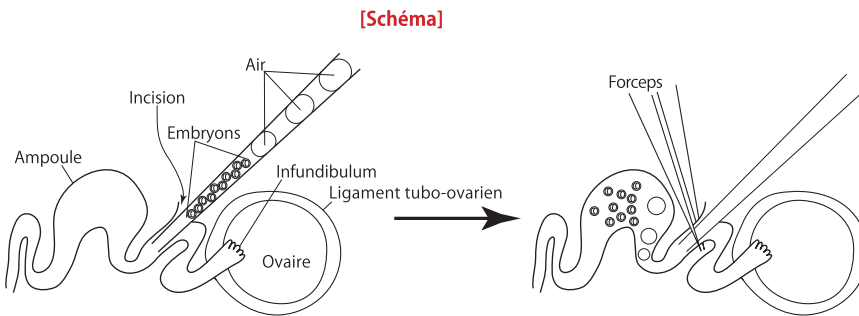


3. Clamper l'amas de graisse attaché au ligament tubo-ovarien.



Positionner l'oviducte

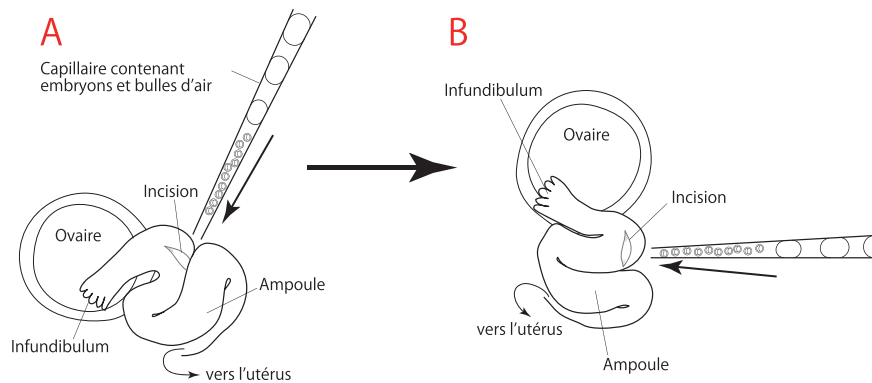
Comme indiqué sur le schéma ci-dessous, la réimplantation par l'oviducte comporte trois étapes : inciser l'oviducte, insérer le capillaire, et décharger les embryons dans l'oviducte en direction de l'ampoule.



Le schéma ci-dessous montrant un oviducte exposé (A) illustre le fait que les oviductes murins sont non seulement petits, mais aussi courbés dans tous les sens.

Ceci rend la réimplantation assez difficile car elle doit se faire en direction de l'ampoule.

Pour faciliter la réimplantation, n'hésitez pas à repositionner le clamp jusqu'à ce que l'ampoule soit bien visible et accessible.



1. Observez l'oviducte au microscope et exposez l'infundibulum et l'ampoule à l'aide des forceps. Replacer le clamp si nécessaire.
2. Placer l'oviducte dans la position la plus accessible en repositionnant entièrement la souris si nécessaire.

Note

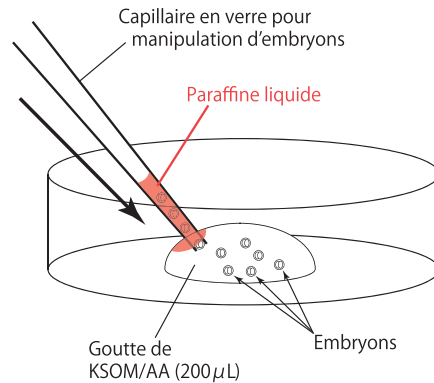
Chaque souris ayant des oviductes avec des replis différents, prenez le temps de bien observer et positionner l'oviducte pour faciliter la réimplantation.

Remarque

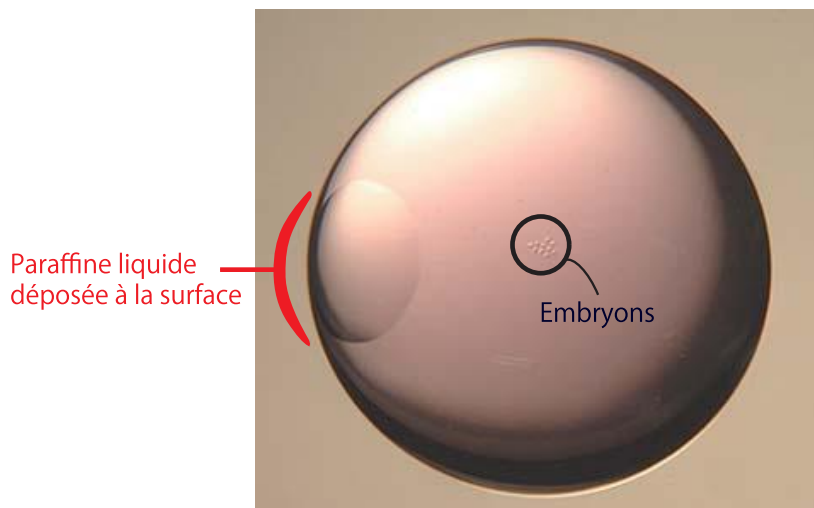
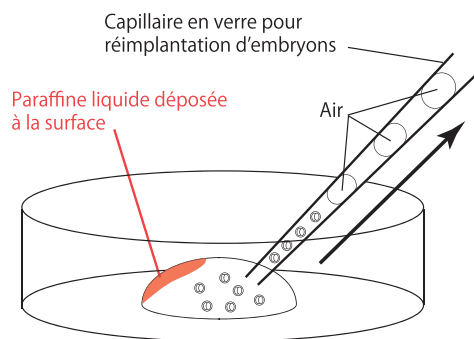
Si vous êtes gaucher, adaptez le positionnement pour une réimplantation du côté gauche.

Préparation des embryons et des capillaires en verre

1. Placer une goutte de 200 μL de KSOM/AA dans une boîte de Pétri (ne pas recouvrir de paraffine liquide) et déposer 20 embryons dans cette goutte.



2. Aspirer alternativement un peu de milieu et d'air pour créer des bulles de 2 à 3 mm dans le capillaire, puis aspirer 10 embryons dans le capillaire.



Remarque

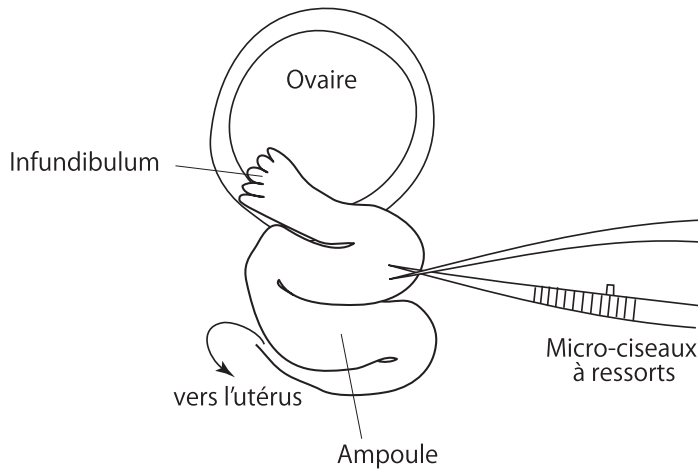
Lorsque le capillaire est inséré dans la goutte pour la première fois, la paraffine liquide se dépose à la surface de la goutte du côté de la pénétration du capillaire.

Aspirez les embryons dans le capillaire par le côté opposé pour éviter la présence de paraffine liquide dans et sur le capillaire.

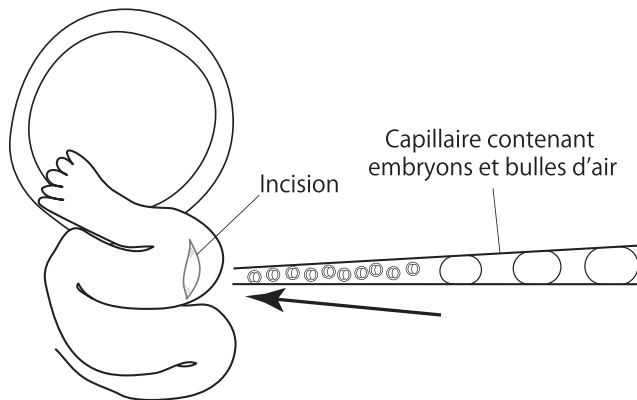
La paraffine liquide est potentiellement néfaste au bon développement des embryons jusqu'à la mise-bas.

Réimplantation

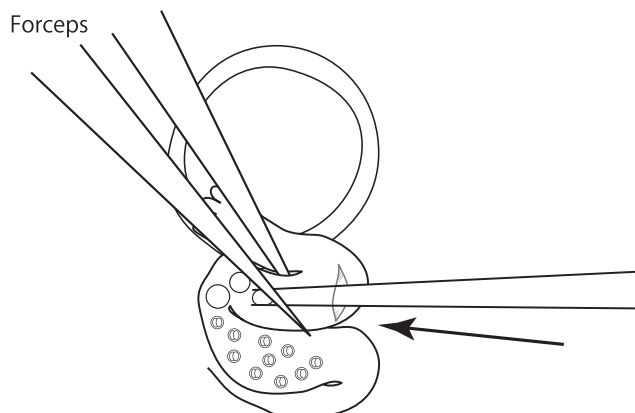
1. Positionnez l'oviducte avec les forceps watchmaker's #5 et faites une petite incision avec les micro-ciseaux dans la paroi de l'oviducte, entre l'infundibulum et l'ampoule.



2. Insérer le bout du capillaire dans l'incision puis enfoncer le capillaire un peu plus profondément en direction de l'ampoule.



3. Maintenez l'oviducte et le capillaire avec un forceps.
4. Décharger les embryons et 2 à 3 bulles d'air dans l'ampoule.



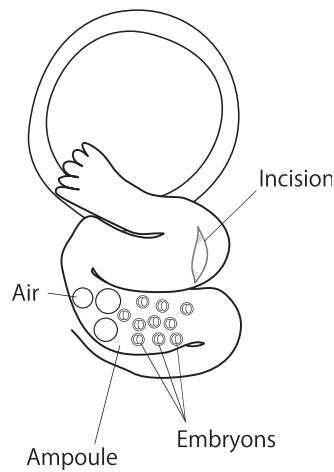
Remarque

Lorsque la réimplantation est opérée correctement, les bulles d'air sont visibles à travers la paroi de l'ampoule.

Note

Si vous ne parvenez pas à expulser les embryons dans l'oviducte, retirer très légèrement le capillaire pour décoller le bout du capillaire de la paroi de l'oviducte et libérer ainsi les embryons.

- Retirer délicatement le capillaire par l'incision.



[Réimplantation d'embryons par l'oviducte] No. 17-01 

- Replacer l'appareil reproducteur (ovaire, oviducte et corne utérine) dans la cavité abdominale et suturer avec des agrafes.



- Répéter l'opération de manière similaire pour réimplanter 10 autres embryons dans le second oviducte.
- 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

- Nakagata N. 1992. Embryo transfer through the wall of the fallopian tube in mice. *Exp. Anim.* 41: 387-388.
- 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.

Note

Ne réimplantez les embryons qu'une fois la position et la direction de l'oviducte ajustées. Lorsque l'oviducte et le capillaire sont placés en parallèle, l'insertion du capillaire est facilitée.

7-3 Réimplantation d'embryons par l'utérus

Matériel and Equipement

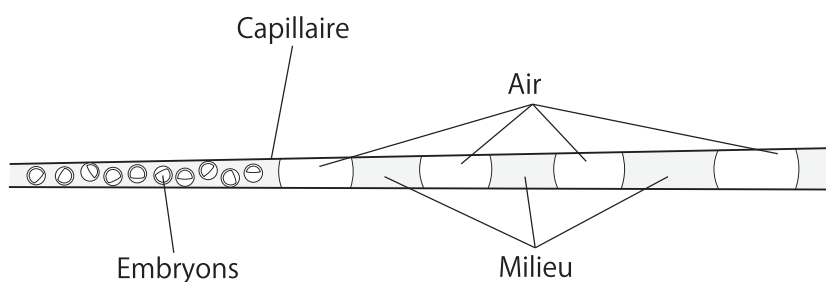
1. Souris femelles au troisième jour de pseudogestation (les femelles sélectionnées ont un bouchon vaginal au premier jour).
2. Anesthésiants
3. Ciseaux de dissection
4. Une paire de forceps watchmaker's #5
5. Clamp (Serrefine)
6. Aiguille de 27 gauges
7. Agrafes de suture (Autoclip 9mm; Clay Adams 427631) et applicateur d'agrafes (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams 427630)
8. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
9. Capillaires en verre pour réimplanter les embryons
10. Plaque chauffante (37°C)

Procédure

Réimplantation

Préparer les souris receveuses, les embryons (du stade 8 cellules au stade blastocyste) et un capillaire en verre en suivant la même méthode que pour la réimplantation par l'oviducte (Reportez-vous au chapitre Réimplantation par l'oviducte en page 67).

1. Saisir l'appareil reproducteur (ovaire, oviducte, corne utérine) de manière conventionnelle.
2. Clamper l'amas de graisse attaché au ligament tubo-ovarien.
3. Aspirer alternativement un peu de milieu et d'air pour créer des bulles de 2 à 3 mm dans le capillaire, puis aspirer 10 embryons dans le capillaire comme indiqué sur le schéma ci-dessous.



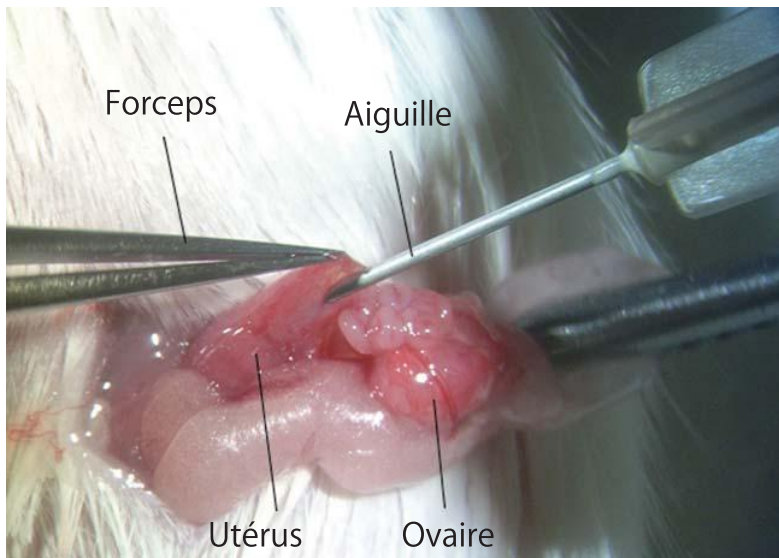
Note

Lors de la préparation des capillaires en verre, évitez de toucher la paraffine liquide.

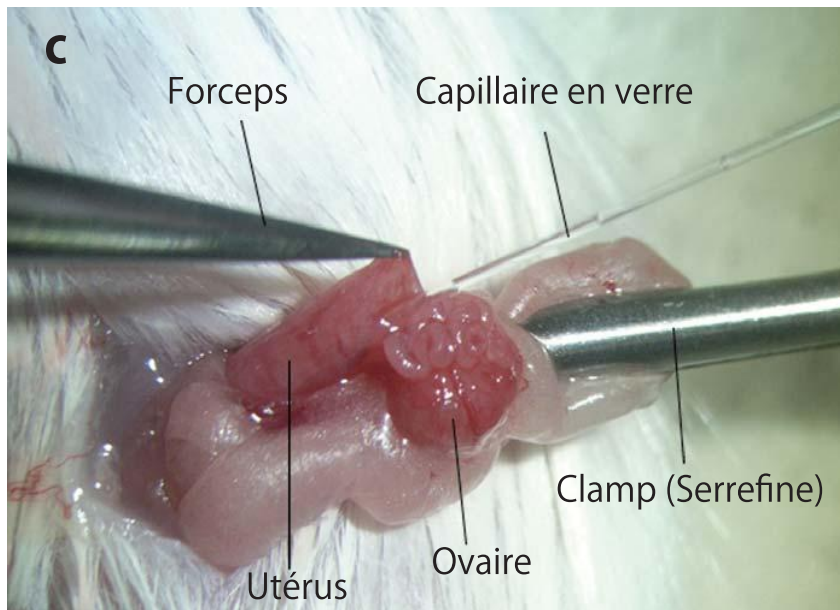
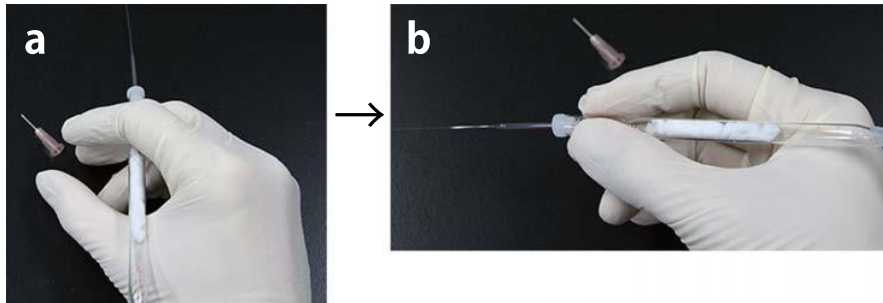
4. Tenez l'aiguille de 27 gauges et le capillaire de réimplantation de la manière illustrée ci-dessous. Observez simultanément le bout du capillaire et l'utérus au microscope, et assurez-vous de placer les deux dans le même plan focal.



5. Maintenez avec précaution la corne utérine à l'aide des forceps, et insérer l'aiguille de 27 gauges dans la paroi de l'utérus jusqu'à pénétration dans la cavité utérine.



6. Retirez l'aiguille et positionnez le capillaire en verre comme indiqué sur les photos a et b. Insérez le bout du capillaire contenant les embryons profondément dans l'utérus en le passant par le trou préalablement percé avec l'aiguille (photo c).



7. Déchargez les embryons dans la cavité utérine ainsi que 2 à 3 bulles d'air.
8. Retirez délicatement le capillaire de l'utérus.

[Réimplantation d'Embryons par l'Utérus] No. 18-01 

[Démonstration de la procédure] No. 18-02 

Note

Tout en maintenant la corne utérine, ne quittez pas des yeux le trou que vous avez fait dans l'utérus jusqu'à ce que la réimplantation soit terminée. Si vous perdez des yeux le trou, il sera difficile de le retrouver.

Note

Si vous ne parvenez pas à expulser les embryons dans l'utérus, retirez très légèrement le capillaire pour décoller le bout du capillaire de la paroi de l'utérus et libérer ainsi les embryons.

Note

Pour vous aider à ne pas perdre le trou des yeux, tenez à la fois l'aiguille et le capillaire en verre avec votre main dominante avant de commencer la procédure.

9. Replacer l'appareil reproducteur (ovaire, oviducte et corne utérine) dans la cavité abdominale et suturer avec des agrafes.



10. Répéter l'opération de manière similaire pour réimplanter 10 autres embryons dans la seconde corne utérine.
11. 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. 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.

7-4 Césarienne et adoption

Si la femelle porteuse n'a pas mis bas à la date estimée, une césarienne est nécessaire.

Matériel and Equipement

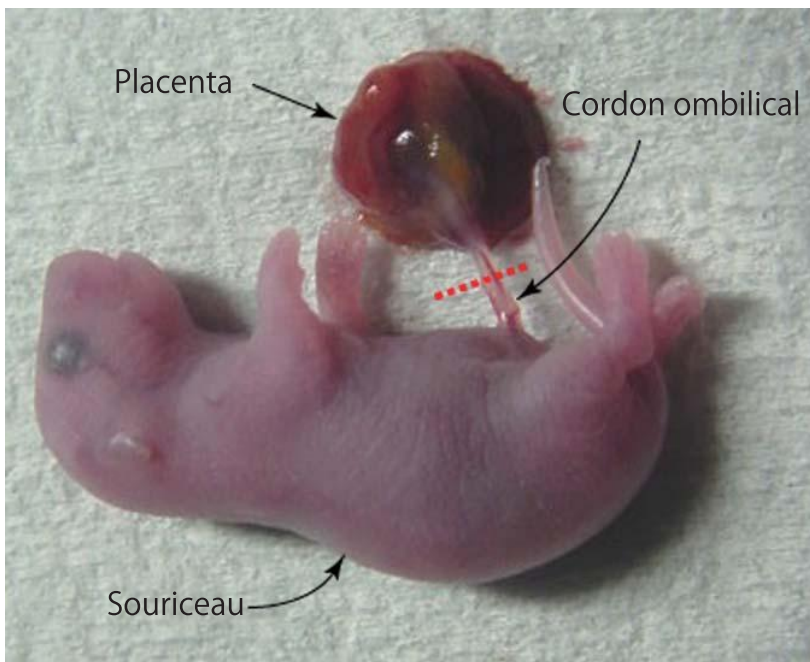
1. Mère adoptive (souris ayant mis bas le même jour ou le jour précédant la date théorique de la mise-bas de la souris enceinte).
2. Ciseaux de dissection
3. Une paire de forceps watchmaker's #5
4. Plaque chauffante (37°C)
5. Souris enceinte (ayant un retard de mise-bas par rapport à sa date théorique).

Procédure

Césarienne

1. Sacrifier la souris enceinte et passer un coton imbibé d'alcool à 70% sur son abdomen.
2. Inciser immédiatement l'abdomen et collecter les utérus contenant les souriceaux avec une paire de ciseaux de dissection.
3. Placer les utérus sur un essuie-tout et inciser la paroi utérine.
4. Retirer rapidement les souriceaux de la membrane vitelline et de l'amnios, puis couper le cordon ombilical de chaque souriceau.

[Disséquer le cordon ombilical]



5. Nettoyer le corps des souriceaux avec un essuie-tout pour enlever le liquide amniotique, les sécrétions, et le sang.
6. Placer les souriceaux sur la plaque chauffante à 37°C et pincer délicatement les pattes des souriceaux plusieurs fois avec des forceps jusqu'à ce qu'ils commencent à respirer par eux-mêmes et que leur teint devienne rosé.


[De la Dissection des Utérus aux premières respirations des souriceaux]

No. 19-01 

Adoption

Sélectionner une mère adoptive dont les souriceaux ont une couleur de pelage différente de celle des souriceaux issus de la césarienne, afin de les différencier plus tard.

1. Retirer la mère adoptive de la cage.
2. Réduire la portée de moitié (par exemple, si la mère adoptive a 10 souriceaux, retirez-en 4 ou 5).
3. Rouler les souriceaux issus de la césarienne dans la litière et mélangez-les avec les autres souriceaux (en essayant de garder le nombre de souriceaux d'origine).
4. Replacer la mère adoptive dans la cage.

[Adoption] No. 19-02 

Références

1. 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.