

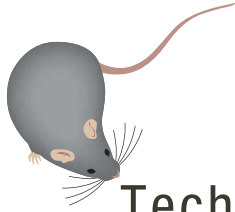
Techniques d'ingénierie reproductive de la Souris

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

8-1 Stockage des milieux et solutions dans des ampoules en atmosphère azotée

Matériel and Equipement

1. Appareil de fermeture hermétique à jet double (Adelphi Manufacturing, West Sussex, UK)
2. Ampoule (stérilisée à haute température (180°C, 3 hours))
3. Milieu
4. Seringue avec aiguille de 18 gauges
5. Forceps
6. Azote gazeux

Procédure

Nettoyage et stérilisation des ampoules en verre

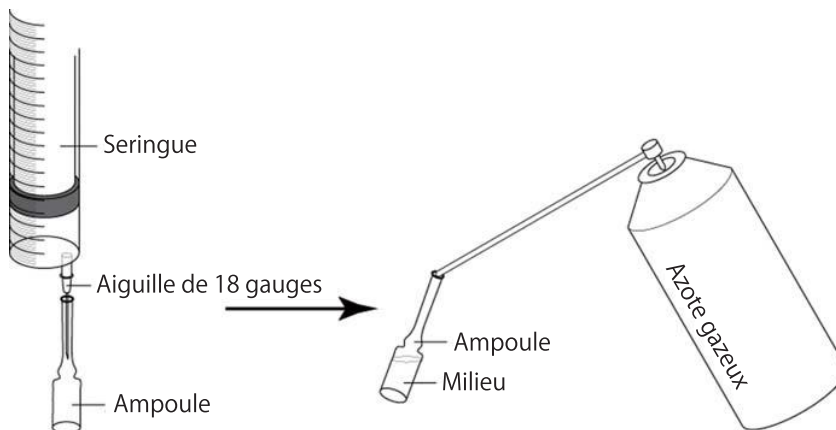
1. Rincer les ampoules en verre à l'eau courante.
2. Rincer les ampoules à l'eau distillée deux fois.
3. Stériliser les ampoules à haute température (180°C pendant 3 heures minimum).

Ignition

1. Ouvrez le robinet de l'appareil de fermeture hermétique à jet double.
2. Ajuster la puissance de la flamme jusqu'à ce qu'elle devienne bleue.

Fermeture hermétique des ampoules

1. Remplir chaque ampoule avec la quantité souhaitée de milieu.
2. Remplir une ampoule d'azote gazeux et immédiatement après fermer hermétiquement l'ampoule avec l'appareil à jet double. Répéter la procédure pour chaque ampoule.



[Remplissage des Ampoules avec du Milieu] No.20-01 

8-2 Tableaux de composition des milieux

mHTF

Composition du mHTF

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	593.8	Sigma	S 5886
KCl	35.0	Sigma	P 5405
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.9	Sigma	M 2773
KH ₂ PO ₄	5.4	Sigma	P 5655
CaCl ₂	57.0	Sigma	C 5670
NaHCO ₃	210.0	Sigma	S 5761
Glucose	50.0	Sigma	G 6152
Na-lactate**	0.34 mL	Sigma	L 7900
Na-Pyruvate	3.7	Sigma	P 4562
Penicillin G	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA (Sérum d'Albumine de Bovin, Fraction V sans acide gras)	400	MERCK/ CALBIOCEM	126575
0.5% phenol red	0.04 mL	Sigma	P 0290

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503

**Solution à 70%

Le mHTF doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

Références

1. Kito S., Hayao T., Noguchi-Kawasaki Y., Ohta Y., Hideki U., and Tateno S. 2004. Improved *in vitro* fertilization and development by use of modified human tubal fluid and applicability of pronucleate embryos for cryopreservation by rapid freezing in inbred mice. *Comp. Med.* 54(5): 564-570.

Hyaluronidase

Composition de la hyaluronidase

Préparer une solution mère à 1% comme indiqué ci-dessous. Stériliser par filtration et congeler (-20 °C) en parties aliquotes de 100 µL. Lors de l'utilisation, diluer la solution mère au dixième. Par exemple, ajouter 20 µL à une goutte (200 µL – volume final) de mHTF contenant les ovocytes pour obtenir une solution finale de 0.1%.

Composé	mg*	Vendeur	Code de référence
Hyaluronidase	10	Sigma	H 3506

*mg/mL diluée dans du mHTF

sucrose 0.3 M (BSA-)**Composition du sucrose 0.3 M (BSA-)**

Composé	mg*	Vendeur	Code de référence
Sucrose	2053.8	Sigma	S 1888

*mg/20 mL de PB1

Composition du PB1 (BSA-)

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503

Le sucrose 0.3 M (BSA-) doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

sucrose 0.3 M (BSA+)**Composition du sucrose 0.3 M (BSA+)**

Composé	mg*	Vendeur	Code de référence
Sucrose	2053.8	Sigma	S 1888

*mg/20 mL de PB1

Composition du PB1 (BSA+)

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503

Le sucrose 0.3 M (BSA+) doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

KSOM/AA**Composition du KSOM/AA**

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	555.0	Sigma	S 5886
KCl	18.5	Sigma	P 5405
KH ₂ PO ₄	4.75	Sigma	P 5655
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.95	Sigma	M 2773
CaCl ₂ · 2H ₂ O	25.0	Sigma	C 7902
NaHCO ₃	210.0	Sigma	S 5761
Glucose	3.6	Sigma	G 6152
Na-Pyruvate	2.2	Sigma	P 4562
DL-Lactic Acid sodium salt	0.174 mL	Sigma	L 1375
10 mM EDTA	100 µL	Sigma	E 6635
Streptomycin	5.0	Sigma	S 9137
Penicillin	6.3	Sigma	P 7794
0.5% phenol red	0.1 mL	Sigma	P 0290
L-Glutamine	14.6	Sigma	G 8540
MEM Essential Amino Acids solution	1.0 mL	GIBCO	11130-051
MEM Non-essential Amino acid solution	0.5 mL	Sigma	M 7145
BSA	100.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503

Le KSOM/AA doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

Références

1. Lawitts J. A., and Biggers J. D. 1993. Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol.* 225:153-164.

sucrose 0.8 M**Composition du sucrose 0.8 M**

Composé	mg*	Vendeur	Code de référence
Sucrose	5476.8	Sigma	S 1888

*mg/20 mL de PB1

Composition du PB1

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503

Le sucrose 0.8 M doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

PB1

Composition du PB1

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503
Le PB1 doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

DMSO 1 M**Composition du DMSO 1 M**

Composé	mL*	Vendeur	Code de référence
DMSO	1.56	Sigma	D 2650
PB1	18.44	-	-

*Volume final : 20 mL

Composition du PB1

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503

Le DMSO 1M doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

DAP213

Méthode de préparation du DAP213

1. Les solutions A et B sont préparées et entièrement dissoutes.
2. Un volume égal de chaque solution (A et B) sont ensuite mélangés pour obtenir le DAP213.

Solution A

Composé	mL*	Vendeur	Code de référence
PB1	2.3088	-	-
DMSO	3.1252	Sigma	D 2650
Propylene glycol (PG)	4.556	Sigma	134368

Attention

La solution peut devenir turbide lorsque le DMSO est ajouté.

Solution B

Composé	mg*	Vendeur	Code de référence
Acetamide (AA)	1181.4	Sigma	A 0500

*mg/10 mL de PB1

Composition du PB1

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503
Le DAP213 doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

sucrose 0.25 M**Composition du sucrose 0.25 M**

Composé	mg*	Vendeur	Code de référence
Sucrose	1711.5	Sigma	S 1888

*mg/20 mL de PB1

Composition du PB1

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503

Le sucrose 0.25 M doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

mWM

Composition du mWM

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	640.0	Sigma	S 5886
KCl	35.6	Sigma	P 5405
KH ₂ PO ₄	16.2	Sigma	P 5655
MgSO ₄ · 7H ₂ O	29.4	Sigma	M 7774
NaHCO ₃	190.0	Sigma	S 5761
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Na-Pyruvate	2.5	Sigma	P 4562
Ca-lactate pentahydrate	46.0	Sigma	C 8356
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
Penicillin G	7.5	Sigma	P 7794
0.5% phenol red	0.2 mL	Sigma	P 0290
20 mM 2-ME	10.0 µL	Sigma	M 7522
100 mM EDTA	50.0 µL	Sigma	E 6635
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503
Le mWM doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.