



UNIVERSITÉ  
LAVAL

Direction des services vétérinaires

Procédure normalisée de fonctionnement

Objet : Dérivation par transfert d'embryons chez la souris	Numéro : C-5
Portée : Ceci est une directive de la Direction des services vétérinaires à l'intention des utilisateurs et du personnel des animaleries de l'Université Laval (campus et centres de recherche affiliés).	
Préparée par Stéphanie Caron <i>Technicienne en santé animale conformité, Direction des services vétérinaires</i>	Date : 31 juillet 2013
Modifiée par Daphnée Veilleux-Lemieux <i>Vétérinaire responsable, Direction des services vétérinaires</i>	Date : 10 mars 2016
Révisée par Anne-Marie Catudal <i>Vétérinaire clinicienne, Direction des services vétérinaires</i>	Date : 17 juin 2016
But : Décrire la procédure de dérivation par transfert d'embryons chez la souris.	Version 2

## Généralités

- La dérivation par transfert d'embryon est utilisée afin d'éliminer les microorganismes nocifs au maintien de colonies exemptes de pathogènes spécifiques.
- La dérivation par transfert d'embryons doit être effectuée par du personnel technique expérimenté de l'animalerie.
- La récolte, le lavage et le transfert des embryons doivent s'effectuer dans des zones différentes. Les codes vestimentaires et la circulation dans l'animalerie doivent être respectés pour éviter la contamination des zones propres.
- Il est fortement recommandé de ne pas déchirer la bourse ovarienne afin de diminuer les risques de pertes liquidiennes et de sang, rendant ainsi le site plus propre et facilitant le transfert d'embryons.
- La technique impliquant le bri de la bourse ovarienne doit être justifiée vu les risques plus importants.

## Matériel

### Superovulation

- Hormone PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin)
- Hormone HCG (Human Chorionic Gonadotropin)

- Seringue 1 cc avec aiguille 27 G
- Souris femelles (donneuses)
- Souris mâles (reproducteurs)

#### Récolte des oviductes

- Piqué jetable
- 2 pinces Dumont #5
- 1 ciseau Mayo
- 1 ciseau Iris
- Plats de Petri

#### Récolte des embryons

- Microscope à dissection (avec source de lumière dans la base)
- 2 pinces Dumont #5 (suggéré)
- Plats de Petri
- Seringue 1 cc
- Filtres Millex 0,22  $\mu\text{m}$
- Milieu de culture M2
- Enzyme Hyaluronidase
- Incubateur à CO<sub>2</sub>
- Pièce buccale, filtre 0,22  $\mu\text{m}$  tubulure et embout P1000 avec filtre
- Pipettes Pasteur
- Brûleur Bunsen ou Microforge

#### Transfert d'embryons

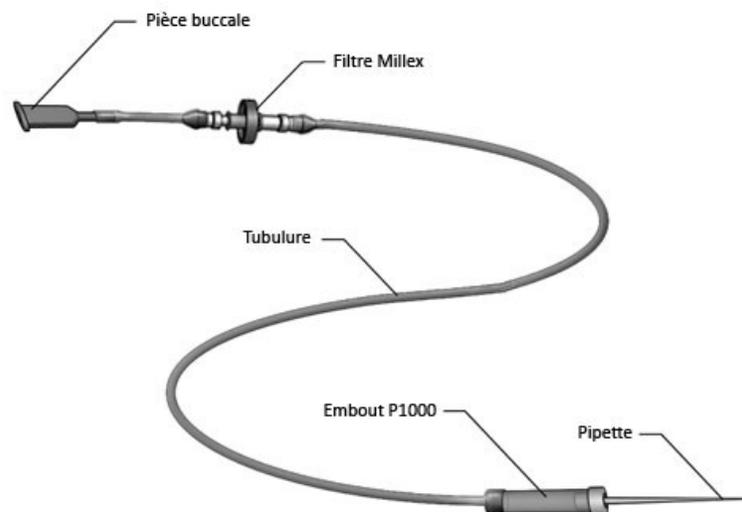
- Souris femelles (CD-1) receveuses
- Souris mâles (CD-1) vasectomisés
- Isoflurane
- Balance
- Chlorexidine
- Alcool isopropylique 70 %
- 0,9 % chlorure de sodium
- Onguent ophtalmique
- Rasoir
- Ciseau Iris droit stérile
- 2 pinces Dumont #5 stériles
- Pince Serrefine stérile
- Champs chirurgical stérile

- Agrafes stériles
- Fil à suture résorbable 4-0 ou 5-0
- Pipette Pasteur
- Brûleur Bunsen ou Microforge
- Pièce buccale, filtre 0,22 µm tubulure et embout P1000 avec filtre
- Gazes 2x2 stériles
- Tapis chauffant

## Procédures

### Assemblage de la pipette à bouche

- Préparer l'assemblage de la pipette à bouche à l'aide d'une pièce buccale, un filtre Millex, de la tubulure et un embout P1000. Un assemblage peut durer plusieurs mois. Insérer les pipettes Pasteur stériles au bout de l'embout P1000 (voir Figure 1).



**Figure 1 - Assemblage de pipette à bouche**

*(Adapté de : Nagy et al. 2003)*

### Superovulation

Le succès de cette procédure dépend de plusieurs facteurs comme l'âge des femelles (idéalement 4-6 semaines), la dose de gonadotropines injectée, l'heure d'injection, le cycle de lumière et la souche de souris.

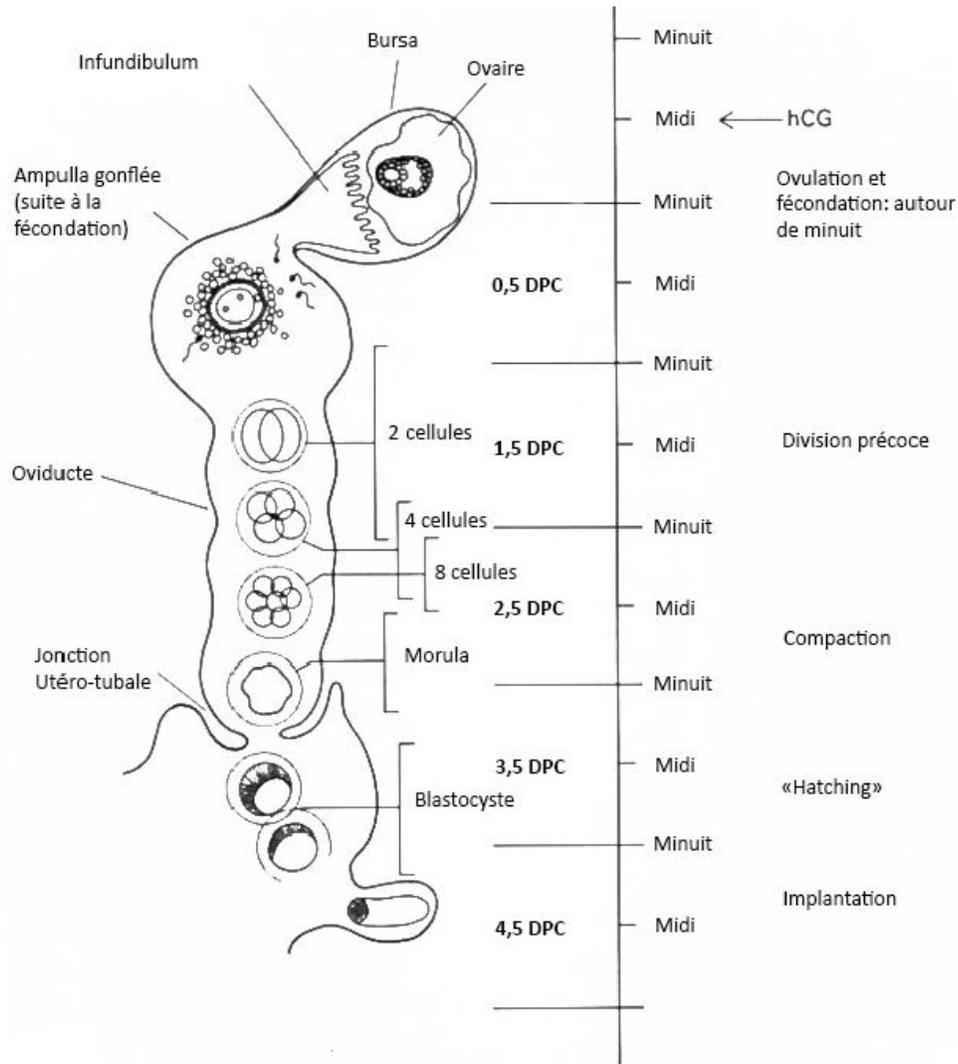
- Injecter aux souris donneuses le PMSG à raison de 0,1 ml/souris intrapéritonéal à une concentration de 50 UI/ml entre 11 h et 13 h. Cette hormone remplace la FSH en activant la maturation des oocytes.
- Quarante-six à quarante-huit heures plus tard, injecter aux souris donneuses le HCG à raison de 0,1 ml/souris intra péritonéal à une concentration de 50 UI/ml.

Cette hormone remplace la LH en provoquant la rupture des follicules matures (superovulation).

- Suite à l'injection de HCG, placer les femelles donneuses en présence de mâles reproducteurs performants dans un ratio de 1 : 1.
- Le lendemain matin, vérifier les femelles pour la présence de bouchons copulatoires. Les embryons auront 0,5 DPC (*days post-coitus*) (voir Figure 2).

#### Récolte des oviductes et des embryons

- Euthanasier une femelle donneuse par dislocation cervicale sous anesthésie à l'isoflurane et déposer la souris sur un piqué jetable. Humecter l'abdomen d'alcool ou de peroxyde d'hydrogène.
- Ouvrir ensuite l'abdomen de la souris à l'aide d'une première paire de pinces, prélever chaque oviducte avec une seconde paire, puis les déposer dans une goutte de milieu de culture (M2) contenue dans un plat de Petri.
- Sous un microscope de dissection, localiser l'ampoule et la déchirer à l'aide de pinces pour laisser sortir les embryons.
- A l'aide d'une pipette Pasteur convenablement forgée (avec une flamme ou un Microforge), transférer les embryons entourés de cellules folliculaires (cumulus) dans un autre plat de Petri contenant une goutte de milieu M2 additionnée d'hyaluronidase reconstituée (0,3 mg/ml) pour dissoudre les cumulus. Laisser reposer les embryons environ 3 à 4 minutes à l'intérieur de l'incubateur à CO<sub>2</sub>.
- Rincer les embryons dans 1 ml de milieu M2 8 à 12 fois afin d'éliminer l'hyaluronidase et les contaminants. Utiliser un nouveau Petri et une nouvelle pipette à chaque fois. Les embryons pourront être gardés à l'incubateur à CO<sub>2</sub> (37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>) jusqu'à l'utilisation.



**Figure 2 - Sommaire du développement aux stades de préimplantation**  
*(Source : Nagy et al. 2003, traduit de l'anglais)*

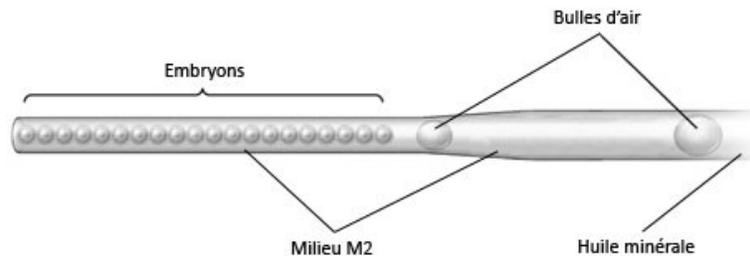
### Préparation des mères porteuses pseudo gestantes

- Sélectionner des femelles (CD-1) en œstrus afin que les mâles acceptent immédiatement l'accouplement.
- Mettre les femelles en présence de mâles (CD-1) vasectomisés dans un ratio de 1 : 1 (cette étape est réalisée en même temps que les femelles donneuses sont accouplées).
- Utiliser les femelles qui présentent un bouchon copulatoire le matin suivant comme mères porteuses.

### Préparation de la pipette de transfert

- Avec une pipette de transfert convenablement forgée, prélever une petite quantité d'huile minérale afin de modérer l'effet de capillarité qu'aura la pipette immergée dans le milieu de culture.

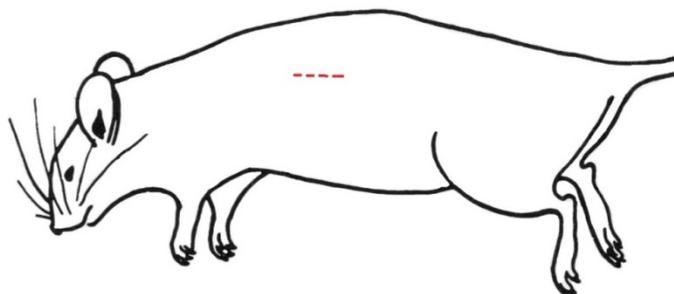
- Aspirer une bulle d'air, une petite quantité de M2 (aussi longue que la portion contenant les embryons) et une autre bulle d'air.
- Aspirer par la suite de 15 à 25 embryons dans un volume minimum de milieu M2 (voir Figure 3).
- Mettre délicatement la pipette de côté et commencer la chirurgie.



**Figure 3 - Chargement de la pipette de transfert**

### Transfert d'embryons

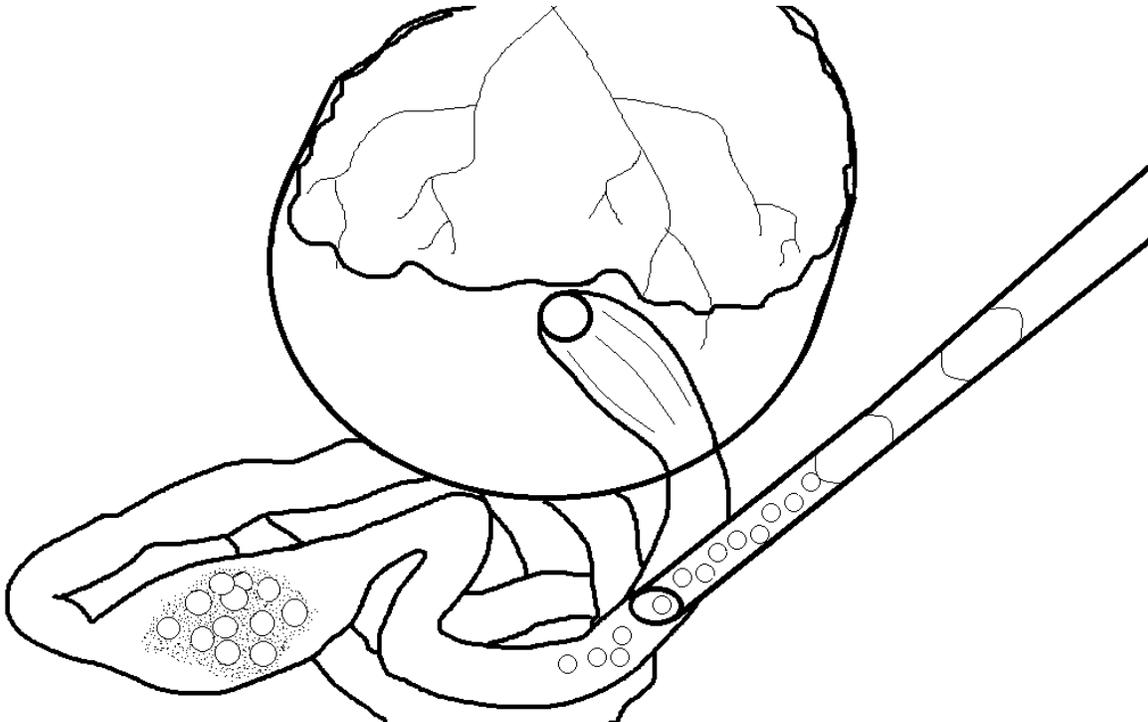
- Le transfert d'embryons dans l'oviducte via l'infundibulum doit avoir lieu 0,5 jour post-copulation.
- Afin de réduire le temps de la chirurgie et le stress de l'animal, le transfert d'embryons est effectué dans un seul oviducte (unilatéral).
- Utiliser la PNF A-1 afin d'établir les doses d'analgésie, d'anesthésique et de fluides à administrer.
- Raser le site chirurgical (environ 2 cm de diamètre) et le désinfecter selon la PNF C-1.
- Pratiquer une incision (0,5-1 cm) de la peau du flanc (voir Figure 4), près de la dernière vertèbre thoracique, à l'aide d'instruments stériles.



**Figure 4 - Site d'incision sur la souris pour le transfert d'embryons**

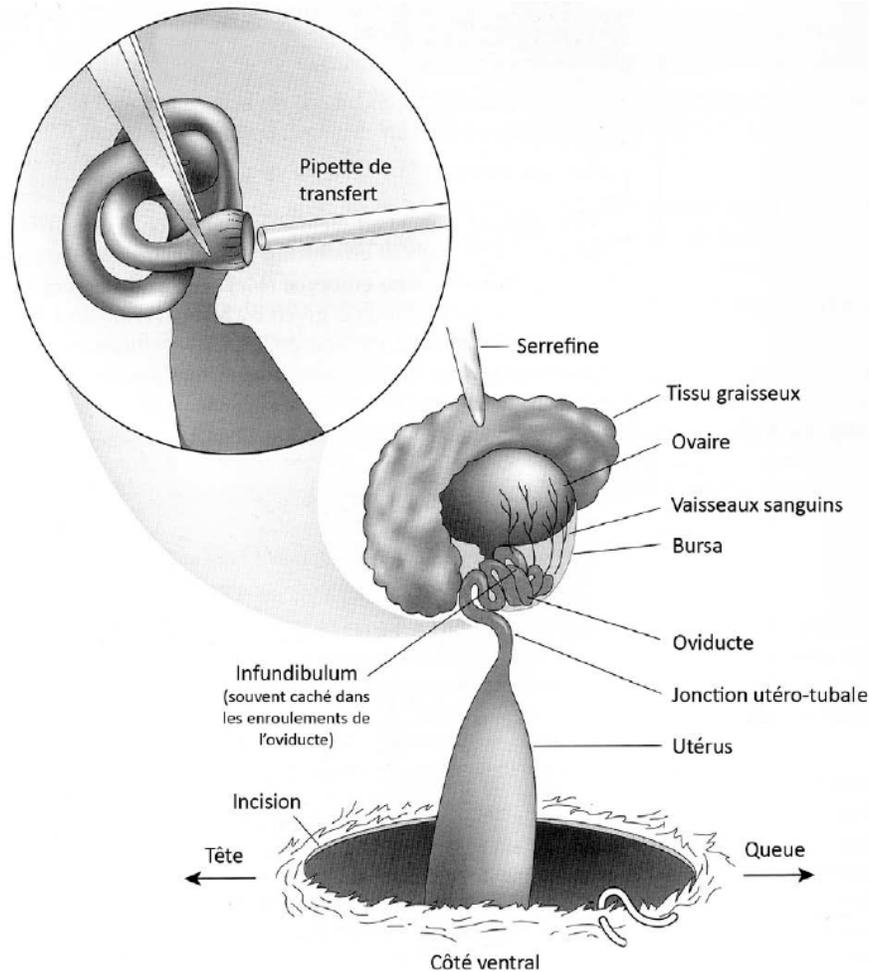
- Pratiquer une incision dans le muscle abdominal. Par la suite, tirer sur les tissus graisseux afin d'exposer l'ovaire, l'oviducte et une petite partie de l'utérus.
- Maintenir les structures à l'extérieur à l'aide d'une pince serrefine, sur une gaze 2x2 stérile et humidifiée de saline (voir Figure 5).

- Ne pas déchirer la bourse ovarienne afin de diminuer les pertes de liquide ou de sang.
- Effectuer un trou à l'aide d'une aiguille 30G x 1 dans l'oviducte entre la sortie de la bourse ovarienne et l'ampoule.
- Insérer la pipette chargée d'embryons dans l'oviducte et souffler délicatement dans la pipette de transfert pour expulser les embryons jusqu'à ce que les deux bulles d'air qui suivent les embryons passent l'ouverture de la pipette. Attention au retour (*backflow*) des embryons.



**Figure 5 - Transfert d'embryon : anatomie du site de transfert (option à privilégier)**

- Retirer délicatement la pipette.
- Réintroduire délicatement l'ovaire et l'utérus dans la cavité abdominale à l'aide de la troisième paire de pinces. Attention de ne pas endommager l'oviducte.
- Refermer le muscle à l'aide de fil résorbable 4-0 et l'incision de la peau à l'aide d'agrafes 7 mm.
- Replacer la souris dans une cage propre et stérile préalablement placée sur un tapis chauffant jusqu'au réveil complet de l'animal.
- Si la technique précédente ne peut être utilisée, repérer et déchirer la bourse ovarienne (bourse) qui recouvre l'ovaire et l'oviducte à l'aide de pinces Dumont #5 en évitant les vaisseaux sanguins.



**Figure 6 - Transfert d'embryon : anatomie du site de transfert**

(Source : Nagy et al. 2003, traduit de l'anglais)

- Insérer la pipette chargée d'embryons dans l'infundibulum et souffler délicatement dans la pipette de transfert pour expulser les embryons jusqu'à ce que les deux bulles d'air qui suivent les embryons passent l'ouverture de la pipette. Attention au retour (*backflow*) des embryons.
- Retirer délicatement la pipette et replacer la bourse sur l'ovaire et l'oviducte.
- L'ovaire et l'utérus sont réintroduits délicatement dans la cavité abdominale à l'aide de la troisième paire de pinces. Attention de ne pas endommager l'oviducte.
- L'incision du muscle est refermée à l'aide de fil résorbable 4-0 et l'incision de la peau est refermée à l'aide d'agrafes 7 mm.
- Replacer la souris dans une cage propre et stérile préalablement placée sur un tapis chauffant jusqu'au réveil complet de l'animal.
- Peu importe la technique utilisée, les bébés devraient naître approximativement entre 19 et 21 jours après le transfert d'embryons.

**Tableau 1 : Calendrier des différentes manipulations**

<b>Jour</b>	<b>Heure</b>	<b>Souris</b>	<b>Manipulation(s)</b>
1	11:00 - 13:00	Donneuse	Injection PMSG IP
3	10:00 - 14:00	Donneuse	Injection HCG IP + Accouplement avec mâles reproducteurs
3	12:00	Porteuse	Accouplement avec mâles vasectomisés
4	8:00 - 12:00	Donneuse	Bouchon copulatoire → récolte d'embryons
4	8:00 - 12:00	Porteuse	Bouchon copulatoire → candidate porteuse
4	8:00 - 12:00	Porteuse	Implantation des embryons

\*Le DPC est calculé à partir de l'accouplement, autour de 00:00 le matin du jour 4.

### Références

Audet, Jean-Nicolas; Filion, Luc; *Dérivation par transfert d'embryon*, 2010.

Nagy, Andras; Gertsenstein, Marina; Vintersten, Kristina; Behringer, Richard; *Manipulating the mouse embryo: A Laboratory Manual* (3<sup>rd</sup> Ed.), 2003.

Shannon L Byers, Michael V Wiles, and Robert A Taft; *Surgical Oocyte Retrieval (SOR): a Method for Collecting Mature Mouse Oocytes without Euthanasia*, January 2009.

Mises à jour de la PNF		
Version 2	17 juin 2016	Précision du choix des techniques d'implantation des embryons pour diminuer les risques.