

Procédure Normalisée de Fonctionnement

TITRE : RÉCOLTE ET PRÉPARATION D'EMBRYONS DE SOURIS POUR MICRO-INJECTION	NUMÉRO : MI-3
DESTINATAIRES : Plateforme de transgénèse de l'UQAM	VERSION 1 : 29.09.2014 VERSION 5 : 2.12.2019
ÉMISE PAR : Normand Lapierre et Manon St-Germain CORRIGÉE : Manon St-Germain, directrice et vétérinaire	CIPA : 20.01.2020
APPROUVÉE PAR : Manon St-Germain, directrice et vétérinaire	DATE : 1.10.2014
BUT : Procéder à la récolte des embryons de souris	

MATÉRIEL :

- PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) (Cedarlane #HOR-272-A)
- hCG (Human Chorionic Gonadotropin) (sigma #CG10-1VL)
- Souris femelles donneuses de 5 semaines
- Mâles reproducteurs
- Seringues de 1 cc
- Aiguilles de 26G
- Isoflurane et équipement d'anesthésie
- Alcool
- Dispositif d'aspiration d'embryons avec pièce buccale (sigma #A5177-5EA)
- Micropipette de transfert (**Voir P.N.F. MI-2**)
- Hyaluronidase (sigma #H3884-100MG)
- Piqué jetable
- Embryomax® advanced KSOM (sigma #MR-101-D)
- Pipette automatique pour 1000, 100, et 10uL
- Binoculaire
- Microforge
- Ciseaux Iris
- Pince Dumont
- Binoculaire
- ÉPI
- Kimwipes®
- Pétris 35 X 10 mm (Sarstedt 83.1800)
- Pétris 50 X 9 mm (Faclon 351006)
- Marqueur permanent fin

SANTÉ ET SÉCURITÉ :

- Le port de gants et de sarrau ou habit de travail de type chirurgical est obligatoire.
- L'effet foeto-toxique de l'isoflurane n'a pas été prouvé. Les femmes enceintes devraient consulter leur médecin avant de travailler avec cet anesthésique.
- Se référer aux F.D.S. disponible dans le bureau SB-M415 pour connaître les risques reliés à la manipulation de l'isoflurane et des autres produits chimiques.
- En cas de déversement de produits chimiques, se référer aux fiches d'urgence affichées près des téléphones dans le SB-M472.

GÉNÉRALITÉS :

- Les procédures se déroulent à l'animalerie du SB.
- Il est important que le cycle de lumière soit de 12h/12h.
- Les femelles donneuses sont de la lignée FVB. L'utilisation d'une autre lignée est possible après entente avec la plateforme de transgénèse de l'UQAM.
- Voir la **P.N.F. MI-2.FABRICATION DE MICROPIPETTES** pour connaître et fabriquer les diverses micropipettes.

PROCÉDURES :

A. Super ovulation

Jour 1

1. Injecter des femelles de 4-5 semaines (donneuses) 0.1 ml IP (aiguille 26G) de PMSG (50 UI/ml) préalablement reconstituer et diluer selon la **P.N.F. MI-1. PRÉPARATION DES SOLUTIONS POUR LA MICRO-INJECTION** entre **11 h et 12 h**. Cette hormone permet la maturation des ovocytes et correspond à la FSH.
2. Inscire la manipulation dans le cahier de micro-injection.

Jour 3

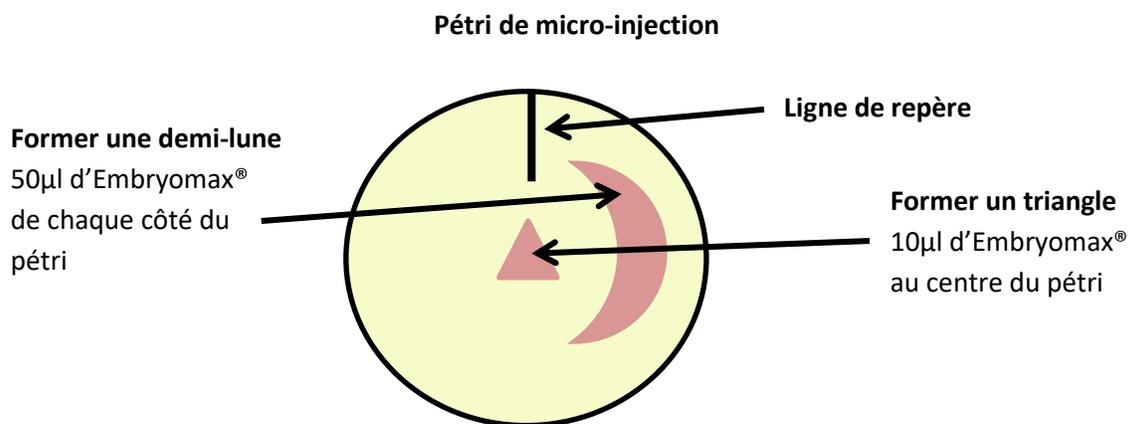
3. Injecter, à ces mêmes femelles **46-48 heures plus tard**, 0.1 ml IP (aiguille 26G) de l'hormone hCG à 50UI/ml préalablement reconstituée et diluée selon la **P.N.F. MI-1. PRÉPARATION DES SOLUTIONS POUR LA MICRO-INJECTION**. Cette hormone est l'équivalent de la LH en induisant la rupture des follicules matures.
4. Placer chacune des femelles dans la cage d'un mâle de la même lignée. L'ovulation et la fécondation devraient avoir lieu autour de minuit.
5. Inscire la manipulation dans le cahier de micro-injection.

Jour 4

6. Vérifier tôt le lendemain matin (avant 8h), la présence d'un bouchon vaginal ou bouchon copulatoire. Les embryons ont 0.5 DPC (Days post-coitus) à ce stade. Seul les femelles avec un bouchon copulatoire sont utilisées pour la récolte d'embryons, les femelles ne présentant pas de bouchon copulatoire sont récupérées pour de la reproduction, offertes pour la mise au point de technique ou euthanasiées selon les besoins.

B. Pétris de micro-injection, Jour 4

1. Avant la récolte des oviductes, préparer 3-4 couvercles de pétris 50mm en traçant, avec un marqueur permanent, une ligne droite pour désigner le haut du pétri.



2. Former un triangle avec 10µl d'Embryomax® au centre du pétri et une demi-lune avec 50µl d'Embryomax® qui servira de zone de nettoyage et d'ajustement de pipettes.

3. Ajouter assez d'huile (**P.N.F. MI-1.PRÉPARATION DES SOLUTIONS POUR LA MICRO-INJECTION**) dans chaque pétris de micro-injection pour recouvrir complètement l'Embryomax® (entre 2,3 et 2,5 ml).

4. Déposer les pétris dans l'incubateur à CO₂ (concentration 5%; à 37°C).

C. Récolte d'embryons, Jour 4

7. Verser dans 2 pétris 35mm du PBS réfrigéré au 2/3 et remettre le couvercle.

8. Prendre toutes les femelles donneuses et les amener dans la salle de manipulation.

9. Euthanasier les souris donneuses par anesthésie à l'isoflurane (3-5%) suivi d'une dislocation cervicale.

10.Placer les souris en position dorsale sur un piqué.

11.Appliquer de l'alcool sur la région abdominale de l'une d'elle.

12.Soulever la peau de l'abdomen, faire une ouverture avec le ciseau en partant du bas jusqu'à l'appendice xiphoïde.

13.Inciser l'abdomen du bas vers le haut avec les ciseaux.

14.Trouver l'ovaire d'un des côtés et procéder à de la dissection mousse pour dégager le gras et les tissus conjonctifs.

15.Appliquer les pinces à la jonction de l'oviducte et de la corne utérine.

16.Sectionner l'oviducte à la jonction utéro-tubale.

17.Sectionner l'attache qui relie l'ovaire à l'infundibulum.

18.Placer l'oviducte dans le pétris rempli de PBS.

19.Procéder aux étapes 14 à 18 de l'autre côté.

20.Répéter les étapes 10 à 19 pour toutes les souris sacrifiées.

21.Placer les carcasses dans un sac rouge de biorisques.

22.Prendre un oviducte avec les pinces Dumont et le déposer dans le second pétris rempli de PBS.

23.Mettre le pétris sous le binoculaire et identifier l'ampoule de l'oviducte.

24.Extraire les embryons en déchirant délicatement la paroi de l'ampoule avec les pinces Dumont. Déposer le reste des tissus sur un Kimwipe®. Faire de même pour tous les oviductes (étapes 21 à 23).

25.Jeter le kimwipe® dans le même sac que les carcasses.

26.Refermer le sac avec une attache et une étiquette rouge complétée.

27. Déposer le sac dans le congélateur dédié aux déchets anatomiques animaux (SB-M402).
28. Préparer un pétris (utiliser les couvercles non utilisés des pétris de micro-injection) avec de l'enzyme hyaluronidase reconstituée dans de l'Embryomax® (se référer à la **P.N.F. MI-1. PRÉPARATION DES SOLUTIONS POUR LA MICRO-INJECTION**) à 0.3 mg/ml pour procéder au nettoyage des cellules folliculaires entourant les embryons.
29. Aspirer, avec une P100, les embryons récoltés dans le pétris de PBS et les déposer dans le pétris avec l'hyaluronidase.
30. Laisser le pétris reposer à température pièce de 3 à 5 minutes pour permettre à l'enzyme de dissoudre les cellules folliculaires.
31. Dans un nouveau pétris contenant 3-4 puits de 50µl d'Embryomax®, nettoyer les embryons dans les puits avec le dispositif d'aspiration d'embryons jusqu'à éliminer toutes les cellules folliculaires.

Durant l'étape 31, la première sélection et le décompte des embryons sont effectués. Les embryons non injectables sont retirés et éliminés immédiatement.
32. Toujours avec le dispositif d'aspiration d'embryons, récolter les embryons du pétris de nettoyage et les déposer dans le haut du triangle d'un des pétris de micro-injection. Placer 20-30 embryons par pétris.
33. Inscire la manipulation dans le cahier de micro-injection.
34. Procéder à la micro-injection des embryons. Se référer à la **P.N.F. MI-4. MICRO-INJECTION D'ADN CHEZ LA SOURIS**.