Procédure Normalisée de Fonctionnement

TITRE : FÉCONDATION *IN VITRO* (FIV)	**NUMÉRO : MI-9**
DESTINATAIRES : Équipe de micro-injection	**Version 1 :** 4.06.2017 **VERSION 5 :** 2.12.2019
ÉMISE PAR : Normand Lapierre, T.S.A. **CORRIGÉE :** Manon St-Germain, vétérinaire et directrice Guillaume Bernas, agent de recherche Labo N.Pilon.	**CIPA :** 20.01.2020
APPROUVÉE PAR : Manon St-Germain, vétérinaire et directrice	**DATE :** 5.06.2017
BUTS : Décrire la marche à suivre pour effectuer une FIV à partir de spermatozoïdes cryorécupérés et de femelles donneuses.	

MATÉRIEL :

- Paille 0.25ml en plastique pour cryopréservation
- Seringues 1ml + aiguilles 30G
- Tubes stériles 10ml
- Huile minérale pour manipulation d'embryons (sigma #M8410-1L)
- Milieu Human Tubal Fluid (mHTF) + BSA
- Milieu HTF (mHTF) + GSH
- Ciseaux iris
- Incubateur CO_2 et bain marie 37°C
- PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) (Cedarlane #HOR-272-A)
- hCG (Human Chorionic Gonadotropin) (sigma #CG10-1VL)
- Azote liquide
- P-touch™ et étiquettes
- Marqueur permanent fin
- Pipettes P1000, P100, P10 + embouts
- Pétris 35 X 10mm (Sarstedt 83.1800)
- Pétris 60 X 15mm (Sarstedt 83.1801)
- Système d'anesthésie et d'euthanasie (Isoflurane, CO_2)
- Binoculaire
- Souris femelles donneuses de 5 semaines
- Mâles vasectomisés et souris receveuses
- Filtres 0.22µm

SANTÉ ET SÉCURITÉ : Les F.D.S. des produits utilisés sont disponibles en version électronique et papier.

PROCÉDURES :

3 jours avant la FIV, superovulation des souris

1. Injecter I.P. les souris donneuses avec de la PMSG entre 18h et 21h. Voir **section A** des **Procédures** de la P.N.F. **MI-3** pour tous les détails (sauf pour l'heure d'injection, indiquée ci-dessus).
    a. Pour FIV récupération de lignée, 12-18 femelles/paille de sperme décongelée
    b. Pour FIV validation *in vitro* ou *in vivo*, 2-4 femelles pour 1 paille de sperme décongelé

1 jour avant la FIV, suite superovulation et pré-incubation.

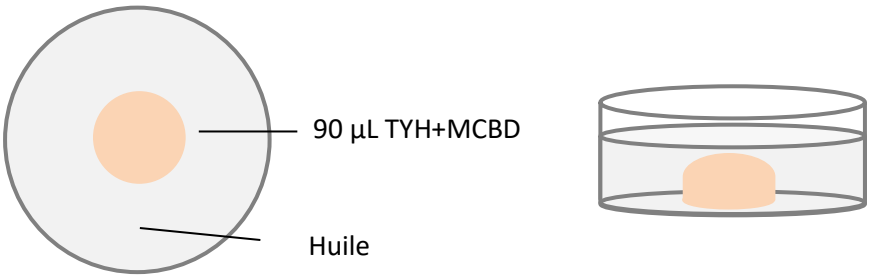
1. Injecter I.P. les souris donneuses avec de la hCG entre 18h et 21h. Voir **section A** des **Procédures** de la P.N.F. **MI-3** pour tous les détails (sauf pour l'heure d'injection, indiquée ci-dessus).

2. Placer l'huile pour embryon dans l'incubateur à 37°C 5%CO2.

3. Placer un bécher d'eau distillée dans le bain marie à 37°C pour la décongélation de la paille.

Jour même de la FIV

1. Préparer un pétri de 35 mm pour la **capacitation de spermatozoïdes** (1 pétri par paille décongelée).
    a. Mettre 90 µL de milieu TYH+MCBD au centre (200µL si spermatozoïdes frais).
    b. Couvrir complètement d'huile pré-incubée à 37°C 5% CO2.
    c. Laisser équilibrer minimum 20 min à 37°C 5% CO2.



2. Préparer le milieu pour la FIV.
    a. Dans un tube eppendorf peser 30.7mg de reduced glutathione (GSH) et ajouter 1 mL de mHTF+BSA.
    b. Vortexer.
    c. De ce mélange, prendre 50 µL et le mélanger avec 5 mL de mHTF+BSA.
    d. Filtrer la solution avec un filtre 0.22µm.

3. Sortir la ou les pailles de sperme à décongeler et les tenir à l'air ambiant pendant exactement 30 secondes.

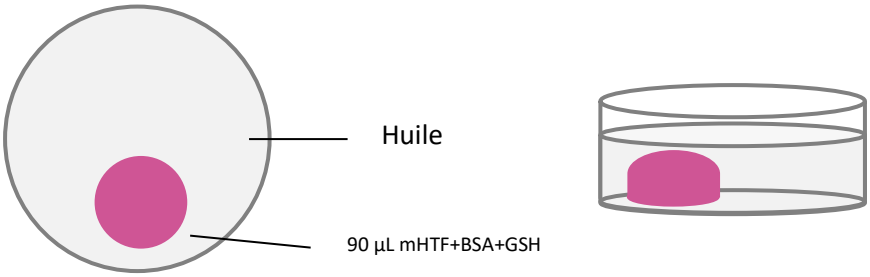
4. Décongeler la ou les pailles de spermatozoïdes en les déposants dans un bain d'eau à 37°C durant 10 minutes.
    a. La paille doit être complètement immergée dans l'eau.
    b. Le bain ne doit pas être brassé ou déplacé durant cette période.

5. Essuyer la paille avec des Kimwipes® et couper les 2 extrémités de la paille.

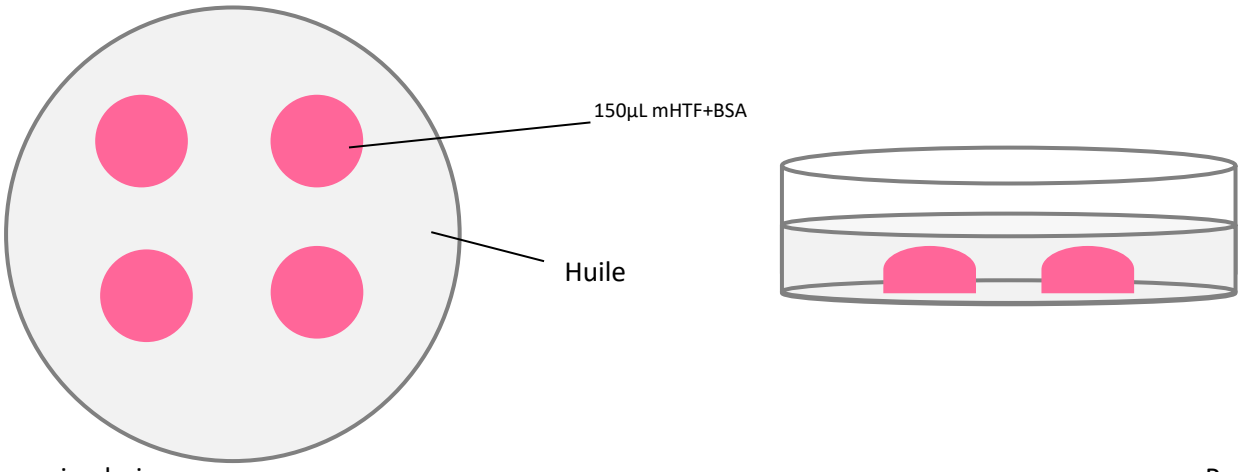
6. Avec une fine tige de métal, pousser le coton et déposer seulement l'aliquot de sprematozoïdes dans le pétri de capacitation (TYH+MCBD). Aucun mHTF+BSA ne doit aller dans le pétri de capacitation.

7. Incuber le pétri de capacitation à 37°C 5% CO2 pour au moins 30 minutes sans mélanger ou déplacer le pétri durant ce temps. S'il s'agit de sperme frais, incuber au moins 60 minutes.

8. Durant la période de capacitation, préparer les pétri pour la **récupération des complexes ovocytes-cumulus (COCs) et FIV**. 1 pétris/3 femelles.
    a. Dans le bas d'un pétris 35mm, déposer 1 gouttes 90µL de mHTF+BSA+GSH
    b. Couvrir complètement d'huile (2,45mL) pré-incubée à 37°C 5% CO2.
    c. Incuber minimum 20 min à 37°C 5% CO2.



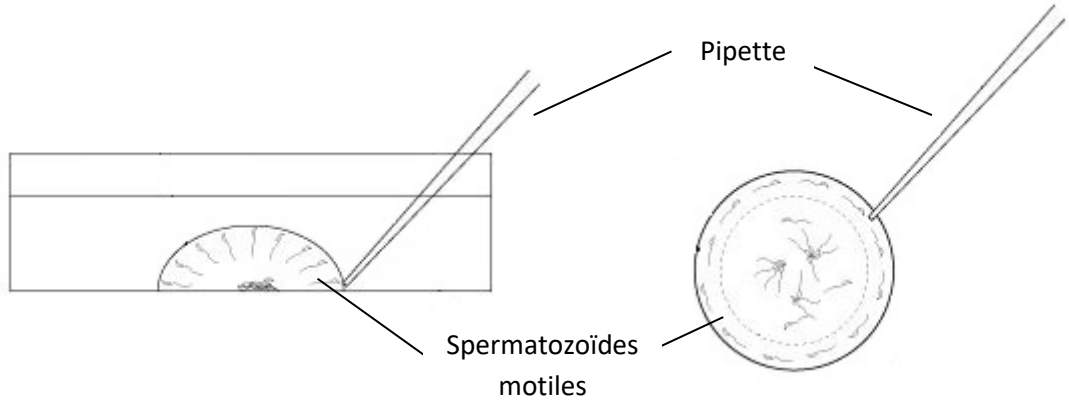
9. Préparer les pétri de **lavage des embryons**. 1 pétris/3 femelles.
    a. Dans un pétri 60mm, déposer 4 gouttes de 150 µLde mHTF+BSA.
    b. Couvrir complètement d'huile (10mL) pré-incubée.
    c. Incuber à 37°C 5% CO2.

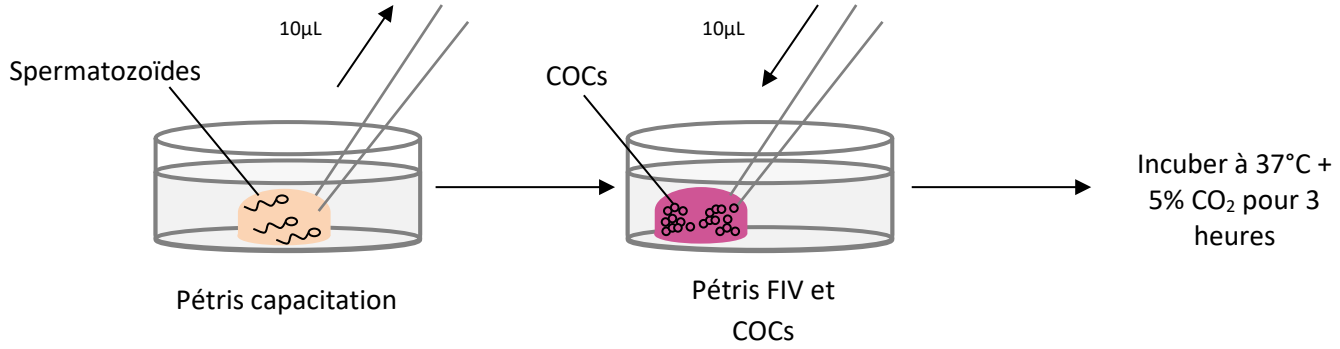


10. Euthanasier les femelles par la méthode Isoflurane/CO_2, tel que décrit dans la P.N.F. **T-11**.

11. Récolter les COCs immédiatement dans les pétris de récupération des ovocytes et FIV (3 femelles/pétris).
    a. Inciser la paroi abdominale
    b. Repérer les oviductes et les récupérer à l'aide de ciseaux et de pinces.
    c. Déposer les oviductes dans l'huile du pétri de récupération des COCs et FIV.
    d. Percer un oviducte avec des pinces pointues afin d'extraire les COCs.
    e. Glisser les COCs avec la pince vers la goutte de mHTF+BSA+GSH.
    f. Répéter pour chaque oviducte.
    g. Cette opération doit se faire rapidement entre la mort des souris et la récupération des COCs, 30-60 secondes par oviductes. Il est conseillé d'y aller par groupe de 3 femelles à la fois.
    h. Incuber à 37°C pour un minimum de 30 minutes.

12. Avec une pipette de 20µL biseautée, prendre 10µL de spermatozoïdes du pétris de capacitation (3µL si frais) et l'ajouter au pétri de récolte des COCs et FIV. Aspirer les spermatozoïdes en périphérie de la goutte, car les plus motiles ont tendance à se tenir en bordure de la goutte.





13. Incuber à 37°C le pétri de FIV pendant 3-4 heures dans un incubateur à CO_2 (5%). Observer le détachement des cellules du cumulus, la concentration et la mobilité de sperme au bout de 30 minutes. Si l'un des facteurs énumérés ci-avant est faible, ajouter un autre 10µL de sperme.

14. À l'aide d'une pipette de transfert, récupérer et transférer les embryons dans le pétri de lavage. Afin d'éliminer les débris cellulaires, le sperme et les ovocytes non fécondables ou non viables, nettoyer les embryons dans les 3 premières gouttes de lavage.

15. Transférer les zygotes présumés dans la 4ème goutte et incuber pour la nuit.

16. Suite à l'incubation de nuit, identifier et compter les embryons qui ont atteint le stade 2 cellules, les morts, les fragmentés et les zygotes 1 cellule afin de déterminer le pourcentage de fécondation (nombre de 2 cellules/total présumé).

17. Préparer un pétris avec de l'Embryomax® pour y transférer les zygotes 2 cellules, en vue de leurs réimplantations dans des femelles pseudogestantes 0.5 jour. Voir la P.N.F. **MI-5** pour les détails de la procédure de réimplantation d'embryons.