

## But

- Décrire la procédure pour une demande de service ainsi que la méthode de suivi des animaux dérivés et/ou cryopréservés à l'animalerie du CRCHU de Québec – Université Laval.

## Généralités

- Aucun dossier ne sera ouvert sans qu'un formulaire FORM-CHU #012 : Demande de service de dérivation et de cryopréservation, ne soit envoyé à l'équipe de dérivation.
- Les tests de bilan de santé exigés à la suite d'une dérivation peuvent varier d'un cas à l'autre (animalerie expéditrice, statut de santé incomplet, etc.).
- Les tests exigés sont déterminés par la vétérinaire de la DSV de l'Université Laval.
- Le service de dérivation et de cryopréservation n'offre aucune garantie de réveil si le sperme ou les embryons ont été congelés par une tierce partie.

## Formulaires reliés à cette procédure

- FORM-CHU #012 : Demande de service de dérivation et de cryopréservation
- A-1 (UL) : Analgésie et anesthésie des rongeurs
- C-1 (UL) : Chirurgie aseptiques chez les rongeurs
- C-5 (UL) : Dérivation par transfert d'embryons

## Matériel

### A. Superovulation

- Hormone PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin)
- Hormone HCG (Human Chorionic Gonadotropin)
- Seringue 1 cc avec aiguille 27 G
- Eau stérile injectable en bouteille de 10 ml
- Souris femelles (donneuses)
- Souris mâles (reproducteurs)

## B. Récolte des oviductes

- Piqué jetable
- 2 pinces Dumont #5
- 2 seringues 1cc avec aiguille 28 ou 30G
- 1 ciseau Iris
- Plats de Petri de 35mm et 60 mm

## C. Récolte des embryons

- Microscope à dissection (avec source de lumière dans la base)
- 2 pinces Dumont #5 (suggéré)
- Plats de Petri de 35mm et 60 mm
- Seringue 1 cc avec aiguille 28 ou 30G
- Filtres Millex 0.22  $\mu$ m
- Milieu de culture M2
- Enzyme Hyaluronidase
- Incubateur à CO<sub>2</sub>
- Pièce buccale, filtre 0.22  $\mu$ m tubulure et embout P1000 avec filtre
- Pipettes Pasteur
- Brûleur Bunsen et Microforge

## D. Transfert d'embryon

- Microscope à chirurgie (avec source de lumière par le dessus)
- 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 et Microforge
- Pièce buccale, filtre 0.22  $\mu$ m tubulure et embout P1000 avec filtre
- Gazes 2x2 stériles
- Tapis chauffant

## Responsabilités

- Seul des techniciens en santé animale qualifiés peuvent effectuer les manipulations reliées à la production, au transfert d'embryons et à la cryopréservation.
- L'assistant-chef du service de dérivation/cryopréservation est responsable de s'assurer du bon déroulement de son service.
- Le chercheur requérant doit compléter sa demande sur le FORM-CHU #012 : Demande de service de dérivation et de cryopréservation.
- La vétérinaire de la DSV est responsable d'autoriser le transfert des souris dérivées à la suite de l'approbation des résultats de santé.

## Procédure

### I. Demande de service

- a) Le chercheur doit compléter le formulaire FORM-CHU 012 : Demande de service de dérivation et de cryopréservation et le soumettre par courriel à : [luc.filion@crchudequebec.ulaval.ca](mailto:luc.filion@crchudequebec.ulaval.ca)
- b) Par la suite, le chercheur recevra par courriel une soumission avec les coûts détaillés en fonction de la procédure demandée.
- c) La soumission doit être acceptée par le chercheur avant que l'équipe de dérivation et de cryopréservation puisse débiter la procédure.
- d) L'équipe de dérivation et de cryopréservation communique avec l'équipe de recherche et le TSA responsable de la colonie afin de coordonner l'échéancier.
- e) Le coût des services sera inclus à la facture de perdiem mensuelle du chercheur uniquement lorsque la procédure est complétée. Dans le cas d'une cryopréservation, la procédure est complétée lorsque la validation a été effectuée.
- f) Lors d'une cryopréservation, un certificat est émis attestant le nom de la lignée qui a été cryopréservée, le # de lot, le nombre de pailles congelées, etc.

### II. Super ovulation des femelles donneuses d'ovules ou d'embryons

1. Injecter une hormone appelée PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) aux souris donneuses à raison de 0.1 ml/souris par voie intra péritonéale à une concentration de 50 unités/ml. Cette hormone remplace la FSH et active la maturation des oocytes.
2. Après 46 à 50 heures, injecter aux souris donneuses une hormone appelée HCG (Human Chorionic Gonadotropin) à raison de 0.1 ml/souris par voie intra péritonéale

à une concentration de 50 unités/ml. Cette hormone remplace la LH et provoque la rupture des follicules matures (super ovulation).

3. Suite à l'injection de HCG, mettre les femelles donneuses en présence de mâles reproducteurs performants dans un ratio d'un pour un s'il s'agit d'une production d'embryons.
4. Le lendemain matin, examiner les femelles et vérifier la présence de bouchons copulatoires s'il s'agit d'une production d'embryons.
5. Le succès de cette procédure dépend de plusieurs facteurs comme l'âge des femelles (idéalement 6 semaines pour récolte d'embryons et 3-4 semaines pour la récolte d'ovules), leurs poids, la dose de gonadotrophine injectée, l'heure d'injection, le cycle de lumière et la souche de souris utilisée.
6. Pour un cycle de lumière 12/12, voici un exemple d'horaire pour les injections :

Récolte d'embryons :

- lundi 12 h00 injection PMSG
- mercredi 11 h 00 injection HCG
- suite à la deuxième injection, placer les femelles avec les mâles reproducteurs
- jeudi matin, vérifier les bouchons copulatoires

Récolte d'ovules :

- lundi 19 h 00 injection PMSG
- mercredi 19 h 00 injection HCG
- jeudi matin 8 h 00, récolte des ovules pour FIV (fertilisation in vitro) soit 13 heures post injection de l'HCG (la fenêtre de perméabilité au spermatozoïde est de 13 à 14,5 heures post injection d'HCG)

7. Le succès de cette procédure dépend de plusieurs facteurs comme l'âge des femelles (idéalement 6 semaines pour récolte d'embryons et 3-4 semaines pour la récolte d'ovules), leurs poids, la dose de gonadotrophine injectée, l'heure d'injection, le cycle de lumière et la souche de souris utilisée.
8. Pour certaines souches, une demi-dose de PMSG donne de meilleurs résultats :

-B6129F1

-BALB/c

### III. Récolte des embryons

1. Sacrifier par dislocation cervicale les femelles accouplées (bouchons copulatoires) et les immerger dans le contenant de Oxivir 1/40.
2. Déposer la souris sur un piqué jetable et déchirer la peau du ventre pour exposer la paroi de l'abdomen. Ceci évite l'utilisation d'une paire de ciseaux supplémentaire et élimine grandement le poil. Ouvrir l'abdomen de la souris et prélever chaque oviducte. Déposer les oviductes dans un pétris contenant 2 ml de milieu de culture

(M2 ou PBS modifié). Éviter que les organes récoltés entrent en contact avec le désinfectant.

3. Sous un microscope de dissection, localiser l'ampoule et déchirer à l'aide de pinces ou d'aiguilles 28 ou 30G afin de laisser sortir les embryons ou ovules.
4. S'il s'agit d'une récolte d'embryons, à l'aide d'une pipette pasteur ou d'une pipette volumétrique (P20), transférer les embryons entourés de cellules folliculaires (cumulus) dans un autre Pétri contenant 0,97 ml de M2 gazé au CO<sub>2</sub> pendant la nuit et 0,03 ml de hyaluronidase pour une concentration finale de 0,3 mg/ml pour dissoudre les cumulus. Laisser reposer les embryons environ 3 à 4 minutes le temps de dissoudre la majorité des cellules folliculaires. **Attention** : un séjour prolongé dans la hyaluronidase a un impact direct lorsqu'il s'agit d'un protocole de digestion de zona à l'aide d'Acide Tyrode.
5. Lors d'une dérivation, pratiquer un minimum de dix lavages dans 10 pétris contenant chacun 1 ml de M2 en utilisant une nouvelle pipette afin d'éliminer la hyaluronidase et les différents pathogènes pouvant se trouver sur la paroi des embryons. On doit obtenir une dilution de 1 dans 100 à chaque lavage (les embryons contenus dans un volume minimal (10µl) nettoyés dans 1000l de M2 à chaque lavage).
6. Conserver les embryons à l'incubateur à CO<sub>2</sub> (37° C, 5% de CO<sub>2</sub>) jusqu'à l'utilisation (congélation, implantation ou autre). Pour une culture à court terme, utiliser un milieu de culture plus approprié (KSOM).
7. S'il s'agit d'une récolte d'ovules : Transférer les ovules entourés de cellules folliculaires (cumulus) directement dans le pétri de fertilisation in vitro sans passage dans la hyaluronidase.

#### IV. Préparation des mères porteuses pseudo gestantes pour implantation, préparation de la pipette de transfert et transfert d'embryons

1. Utiliser la PNF A-1 pour établir les doses d'analgésie, d'anesthésique et de fluides à administrer.
2. Utiliser la PNF C-1 et C-5 pour préparer la femelle receveuse pour la chirurgie d'implantation d'embryon et effectuer le transfert.

#### V. Congélation d'embryons

1. Après la récolte des embryons ou à la FIV, les embryons obtenus peuvent être mis dans ±500 µl de propylène glycol (PrOH) (1.5 Molaire) pour 15 minutes d'équilibre.
2. Pendant les 15 minutes, les embryons peuvent être introduits dans une paille à congélation de 0,25 ml préalablement chargée comme suit en partant de l'ouverture: un espace d'aire de ±40 µl, ±20 µl de propylène glycol, ±10 µl d'air, ±100 µl de de sucrose (1.0 Molaire) et finalement le bouchon de polyvinyle alcool (PVA) imbibé de

sucrose et solidifié.

3. Une fois les embryons dans la fraction de PrOH, sceller le bout de la pipette avec une scelleuse à chaud et attendre la fin du 15 minutes. Mettre de 10 à 100 embryons par paille. Penser qu'au réveil, en moyenne, 90% des embryons sont viable.
4. Après 15 minutes d'équilibre mettre dans le Biocool (Bain de congélation à température contrôlé) à -70°C pour 5 minutes, ensuite ensemer de glace en touchant le haut de la portion de sucrose prêt du bouchon de PVA avec une pince ayant trempée dans l'azote liquide.
5. Attendre 3-5 minutes que la glace atteigne la portion de PrOH et débiter la descente en température de 0,60°C par minute pour ±38 minutes afin d'atteindre -300°C.
6. Plonger ensuite les pailles directement dans l'azote liquide et entreposer.

## VI. Suivi des animaux post-dérivation

1. Après la procédure, placer les femelles receveuses sur un support de cage différent de celui de la colonie des animaux du service de dérivation afin de donner naissance à une génération d'animaux exempts de pathogène spécifique.
2. Au moment du sevrage des bébés effectuer si nécessaire le bilan de santé recommandé par le vétérinaire de la dsv.
3. Les portées sont transférées uniquement à la suite de l'approbation des résultats de santé par la vétérinaire.

|                           | <u>Modifications apportées</u>                                                                    |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Version 2<br>19 août 2024 | <ul style="list-style-type: none"><li>• Ajout des références aux PNF UL A-1, C-1 et C-5</li></ul> |