

But

- Décrire la procédure de dérivation d'une colonie transgénique ou Ko vers un statut axénique 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.
- Toutes les manipulations d'une dérivation standard sont appliquées au model axénique. Cependant, toutes les manipulations de lavage et d'implantation des embryons se déroulent dans un isolateur semi-rigide.
- Une attention particulière est portée sur le choix des produits utilisés afin que toute solution entrant dans l'isolateur laboratoire où se déroule la chirurgie, soit stérilisée par filtration à 0.22 µm sous cabinet biologique ou hotte à flux laminaire dans les conditions les plus strictes et entrée de façon stérile dans l'isolateur.
- Les gaz anesthésiants (isoflurane dans l'oxygène), s'ils sont utilisés, doivent être stérilisés par double filtration à 0.22 µm avant l'entrée dans l'isolateur.
- Les équipements utilisés doivent être de préférence stérilisés à l'autoclave, ou lorsque la nature de l'équipement ne le permet pas, désinfectés au Clidox ou à l'oxyde d'éthylène.
- Une tubulure destinée au pipetage buccale des embryons est installée et scellée dans une des parois de l'isolateur. Un double filtre 0.22 µm contrôle l'entrée des pathogènes.
- L'utilisation de matériel stérilisé par irradiation est limitée au minimum voir même évité. La plupart du matériel stérilisé par irradiation a une dose cumulée de 25KGray alors qu'un statut axénique doit avoir atteint une dose cumulée de 45KGray.
- 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.

Matériel

- Isolateur semi-rigide de type Park BioServices équipé d'un Binoculaire
- Matériel standard de manipulation d'embryons

Définitions

Axénique : Se dit d'un élevage ou d'un animal totalement indemne de germes saprophytes ou pathogènes.

Formulaires reliés à cette procédure

- FORM-CHU #005 : Registre des activités quotidiennes
- FORM-CHU #012 : Demande de service de dérivation et de cryopréservation
- HEB-07 Hébergement des souris axénique
- FON-10 Méthode de travail en isolateur semi-rigide à statut axénique
- FON-11 Mise en service d'un isolateur axénique
- FON-12 Stérilisation du matériel destiné aux colonies axéniques
- SER-05 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

Responsabilités

- Seul des techniciens en santé animale qualifiés peuvent effectuer les manipulations reliées aux isolateurs des souris axéniques.
- 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.

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
- 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 débuter 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.

II. Étapes pré-implantation

Se référer à la procédure SER-05 pour les méthodes de super-ovulation de récolte de sperme/oocytes et la technique de FIV.

III. Implantation des embryons

1. Après la FIV, si vous êtes prêt à implanter (si vous avez des femelles pseudo gestantes) faire 4-5 lavages de 1ml dans du M2 et mettre tous les embryons dans une paille. Sceller la paille aux deux bouts et lorsque vous serez prêts, mettre la paille dans le SAS de l'isolateur de chirurgie en l'immergeant dans le chlore.
2. Si vous n'avez pas de femelles pseudo gestantes, congeler les embryons en suivant les procédures de la PNF SER-05. Lorsque vous serez prêts, décongeler votre paille (PNF SER-05) et faire le point 1.

IV. Planification des femelles pseudo gestantes et des mâles vasectomies.

1. La veille de l'implantation, sélectionner toutes les femelles en œstrus et les mettre dans un ratio d'un pour un avec un mâle vasectomisé.
2. Le lendemain matin, examiner les femelles et vérifier la présence de bouchons copulatoires. Celles qui auront un bouchon pourront être transférées dans l'isolateur de chirurgie pour une implantation future.

V. Implantation

1. L'implantation d'une lignée axénique a les mêmes manipulations qu'une implantation SPF sauf que le tout se déroule dans l'isolateur.
2. Tout le matériel utilisé a été préalablement entré "axéniquement" dans l'isolateur. Le seul matériel qui vous reste à entrer est : la paille (embryons) et une bouteille de M2 neuve.
3. Une fois tout le matériel entré dans l'isolateur, laver les embryons dans 6 pétris d'environ 1ml de M2.

4. Par la suite, aspirer une petite quantité de M2, suivi d'une bulle d'air, d'une autre petite quantité de M2 et d'une autre bulle d'air.
5. Aspirer par la suite de 10 à 30 embryons (selon la disponibilité ou le taux de survie envisagé) dans un volume minimal de M2 et finalement une dernière petite bulle d'air.
6. Déconnecter la pipette du dispositif de pipetage et mettre délicatement la pipette de côté.
7. Anesthésier les femelles pseudo gestantes à l'isoflurane.
8. À noter qu'il n'y a pas d'injection d'un analgésique, car il y a un trop gros risque que de contamination. Le rasage et la désinfection du site sont retirés de la procédure, car il n'y a pas de risque de contamination de la plaie. Il n'y a pas de tapis chauffant, car trop difficile à désinfecter pour l'entrer dans l'isolateur.
9. Une petite gaze imbibée d'eau est utilisée au lieu de l'Onguent Ophtalmique pour garder les yeux humides.
10. Placer la souris sur la plateforme du microscope en décubitus latéral, vérifier le réflexe pédaire et commencer la chirurgie. (SER-05)

VI. Suivi des animaux post-implantation

1. Après la procédure, remettre les souris dans leur cage respective.
2. Effectuer des tests de microbiologie selon la PNF CQ-08 pour vous assurer que les souris sont bien axéniques.
3. Au sevrage, transférer les animaux axéniques dérivés dans un isolateur où le chercheur pourra continuer son protocole.

	<u>Modifications apportées</u>
Version 2 21 août 2024	• Ajout des références à la procédure SER-05