

¹ Institut Clinique de la Souris, PHENOMIN, CNRS UMR7104, INSERM U964, Université de Strasbourg, 1 rue Laurent Fries BP 10142 Parc d'Innovation 67404 Illkirch, France.

² Equipe 10 : Biologie du système neuromusculaire, INSERM IMRB U955, UPEC Faculté de médecine- 8 rue du Général Sarrail 94100 Créteil, France

³ Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (IPBS), CNRS-UPS (UMR 5089), 205, route de Narbonne BP 64182 - 31077 TOULOUSE Cedex 4, France

⁴ Service de Transgénèse ciblée et Cellules Souches Embryonnaires, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, CNRS-UMR 5535, 1919 Route de Mende 34293 Montpellier - Cedex 5, France

⁵ Adresse actuelle : Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, France

•Contribution équivalente des auteurs

Préambule

L'objectif de ce protocole est de décrire les étapes et les contrôles qualités permettant d'établir de nouvelles lignées de cellules Souches Embryonnaires murines stables (mES ou ES dans la suite de ce document) :

- soit à partir d'embryons de souris sauvages (Wild type : WT) : pour introduire une mutation par ciblage génétique par recombinaison homologue et obtenir une lignée de souris génétiquement modifiée ;
- soit à partir d'embryons de souris génétiquement modifiées avec deux objectifs : (1) pour effectuer une analyse phénotypique *in vitro* des cellules issues de la différenciation de ces cellules ES (par exemple pour accéder aux cellules différenciées en cas de létalité embryonnaire des souris mutantes, pour accéder à des populations cellulaires faiblement représentées *in vivo*), ou (2) pour introduire de nouvelles mutations dans ces cellules ES mutantes et ainsi créer des animaux multitransgéniques.

Les cellules ES dérivent de la masse cellulaire interne (ICM, Inner Cell Mass) d'embryons de 3,5 jours : les blastocystes (E3.5). Des conditions de culture permettant l'établissement de lignées ES murines ont été publiées et utilisées depuis leur premier isolement en 1981 (Evans et Kaufman 1981 ; Martin 1981). Ces conditions de cultures efficaces pour établir des lignées de cellules ES à partir de souris de fond génétique 129, ne permettaient pas ou très difficilement d'obtenir des cellules ES d'autres fonds génétiques couramment utilisés dans les expériences de transgénèse, tels que le fond C57BL/6.

En 2008, l'équipe d'A. Smith révolutionne l'établissement des lignées d'ES en mettant au point un milieu contenant 2 inhibiteurs des voies de signalisation MEK/GSK3, importantes dans la différenciation cellulaire : le milieu 2i (Ying 2008). Ce milieu utilisé dans la première phase de l'établissement de nouvelles lignées de cellules ES (culture des blastocystes pour permettre le développement de l'ICM) a permis d'obtenir, avec de bons rendements, des cellules ES de très bonne qualité à partir de fonds génétiques murins réputés jusque-là non permissifs (Nichols *et al.*, 2009; Ying *et al.*, 2008) mais a également permis d'établir et de maintenir en culture les premières lignées d'ES chez le rat (Buehr *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008)

Le protocole présenté ici résulte de la mise en commun du savoir-faire de quatre laboratoires et propose donc des variantes. Il est assez facile à mettre en œuvre et utilise un équipement relativement standard. Cependant, sa réussite dépend des maîtrises de la manipulation d'embryons aux stades préimplantatoires et de la culture des cellules ES. La mise en œuvre de ce protocole exige un mois de travail et d'attention continus.

Nous remercions les membres de l'ex groupe de travail WP8 du réseau ROCAD (<http://www.rocad.org/fr/>), en particulier Geneviève Tavernier, Rémi Pierre, Frédéric Fiore ainsi que Philippe André, pour leur relecture et remarques avisées.

Consommables, matériel et équipement :

- Boîtes 4 puits (par exemple *Thermo Scientific #176740*) ou plaques 24 puits (par exemple *Costar #3526*)
- Boîtes de culture de 35 mm de diamètre (par exemple *Falcon #353001*)
- Boîtes de 60 mm de diamètre (par exemple *Falcon #353004*)

- Plaques 6 puits (par exemple *Corning #353046*)
 - Micropipettes de transfert de blastocystes (100 µm) (par exemple tubes à hématocrite *Dutscher #090525*, étirés à la flamme)
 - Capillaires (*Harvard Apparatus LTD # GC120-10*, distribués par PHYMEP) à siliconer* (Solution de Silicone en isopropanol – *SERVA # 35130.02* distribuée par Coger) pour le transfert des ICM.
 - Système d'aspiration buccale : embout buccal + tube souple en latex + filtre 0,22 µm + capillaire étiré
 - Loupe binoculaire, si possible sous hotte à flux laminaire
 - Incubateur à CO₂ de 5 à 7,5 % selon les pratiques du laboratoire
- * **Fabrication des capillaires siliconés (sous sorbonne) : optionnel**
 - Transvaser les capillaires dans le tube d'origine en verre, vide (sans disque de coton dans le fond).
 - Verser lentement la solution de silicone jusqu'à saturation en prenant soin d'éviter de créer des bulles à l'intérieure des capillaires.
 - Laisser reposer 10 min.
 - Renverser pour jeter la solution silicone (récupérer la solution de silicone pour l'éliminer selon procédure interne).
 - Rincer 2 fois avec H₂O déminéralisée.
 - Egoutter les capillaires sur papier filtre.
 - Sécher 2 heures à 110°C dans un four à stérilisation en chaleur sèche (par exemple : Poupinel)
 - Etirer les capillaires de façon à obtenir une ouverture interne de la pointe d'un diamètre de 50 à 80 µm, pour permettre le maintien de l'ICM sans pour autant l'aspirer complètement.

Réactifs et milieux :

1. Réactifs

- **Gélatine** (Utilisée pour le coating des toutes les boîtes de culture)
0,5 mg de gélatine (*Sigma # G9382*) qsp 500 ml d'eau milliQ. Autoclaver (aide à la dissolution de la gélatine) puis filtrer sur 0,22 µm
OU

Gélatine commerciale : *PAN Biotech #P06-20410* ou *Millipore #SF008* prêtes à l'emploi

Conservation : à 4°C ou à T° ambiante pendant plusieurs mois

- **PBS sans Calcium ni Magnésium**
Par exemple *Eurobio #CS1PBS01-01*
- **Trypsine 0,25%**
Par exemple *Life technologies # 25200072*

- **Sérum de veau fœtal (SVF) et SVF-ES**

Il existe de nombreux fournisseurs de sérum de veau fœtal. Si les cellules ES sont cultivées dans un milieu contenant du SVF, le lot de SFV (et non pas uniquement le fournisseur ou la référence) doit être testé par le fournisseur comme « ES Cell Qualified » ou validé en interne par le laboratoire pour la culture des cellules ES. Cette qualité de SVF est référencée par la suite comme SVF-ES. Le SVF utilisé pour la congélation des cellules ES ou pour la culture des feeders n'a pas besoin d'être de cette qualité.

- **DMSO stérile**

Par exemple *VWR international # 1.02931.0500*

2. Milieux de culture

Tous les milieux de culture doivent être préchauffés à 37°C ou tempérés avant utilisation. Ils peuvent se conserver 1 mois à 4°C.

Milieu Fibro :

Utilisé pour la culture des fibroblastes embryonnaires de souris (ou MEF pour « Mouse Embryonic Fibroblasts » ou après leur inactivation à la mitomycine (appelés alors « feeders »).

500 ml DMEM 4,5 g/L, High Glucose, Na pyruvate, avec glutamax (Life Technologies # 31966-021)
55 ml de SVF (environ 10%)
Antibiotiques (par exemple Gentamicine à 40 µg/ml OU Pénicilline/Streptomycine (100 units/ml et 100 µg/ml respectivement)

• Milieu de prélèvement des blastocystes

Au choix selon le laboratoire : Milieu M2 (par exemple *Sigma #M7167-100ML*) ou CZB (*Millipore # MR-019-D*) ou milieu [DMEM glutamax (*Life Technologies #31966-047*) supplémenté de 10% SVF]

• Milieu 2i :

Utilisé pour la culture des blastocystes sur feeders

D'après Ying, Q.L. et al, 2003 ; 2008

Conservation et préchauffage : ce milieu se conserve jusqu'à un mois à +4°C à l'abri de la lumière. A préchauffer extemporanément

Pour 10 ml :

- 5 ml milieu DMEM/F12 (*Life Technologies #31331-08*)
- 5 ml milieu Neurobasal (*Life Technologies # 21103-049*)
- 50 µl N2 100X (*Life Technologies #17502-048*)
- 100 µl B27 50X (*Life Technologies #17504-044*)
- 50 µl Glutamax 100X (*Life Technologies # 35050038*)
- 5 µl d'insuline à 20 mg/ml ou 10 µl à 10mg/ml (*Sigma #I1882* ou Sigma I9278 respectivement*)
- 10 µl BSA à 20 mg/ml (*par exemple Sigma #A3311*)
- 0,14 µl MTG (Monothiolglycérol *Sigma #M6145*) ou 10 µl de Bétamercapto-Ethanol (BME) 0.1 M *
- 1 µl PD0325901 à 10 mM *
- 3 µl CHIR99021 à 10 mM *

* Solubilisation des inhibiteurs à 10 mM , de l'insuline ref I1882 et préparation du BME 0,1 M

- PD0325901 (MEK inhibiteur, par exemple *Axon medchem BV #1408*) : reprendre 5 mg dans 1,036 ml de DMSO

- CHIR99021 (GSK3β inhibiteur, par exemple *Axon medchem BV #1386*) : reprendre 5 mg dans 1,074 ml de DMSO.

Ces deux inhibiteurs reconstitués directement dans les flacons doivent être conservés à -20°C et restent stables après reconstitution.

- Insuline *Sigma # I1882* : resuspendre les 100 mg d'insuline dans 5 ml d'eau acidifiée (100 µl d'acide acétique qsp 10 ml d'eau stérile). La référence I9278 est prête à l'emploi.

- Solution stock de Bétamercapto-Ethanol (BME) 0,1M (ou 1000X): Diluer 100 µl de la référence *Sigma #M3148* dans 14.1 ml d'eau stérile. Filtrer sur 0.2µM. Conserver maximum 15 jours à +4°C. Toute autre référence de qualité « culture cellulaire » est aussi possible. Dans ce cas, ajuster le volume de façon être à 0,1 mM final dans le milieu 2i.

• Milieu 15% KSR (± 2% SVF)
Utilisé pour la culture des cellules ES après dissociation de l'ICM

Conservation : jusqu'à un mois après décongélation du KSR à +4°C (idéalement moins de deux semaines).

Pour 100 ml :

- 80 ml de DMEM KO *(Life Technologies #10829018)*
- 15 ml KSR_KnockOut TM Serum Replacement *(Life Technologies #10828028)*
- 2 ml SVF-ES (optionnel)
- 1 ml Pénicilline/Streptomycine (10000 units/ml et 10000 µg/ml respectivement) **OU** autre selon le laboratoire
- 1 ml L-Glutamine 100X ou Glutamax
- 1 ml Acides aminés non essentiels 100X *(Life Technologies# 11140035)*
- 100 µl BME 0.1 M (0,1 mM final)
- 10 µl LIF (1000U/ml final) (LIF = Leukemia inhibitory factor, par exemple *Millipore #ESG1107*)

• Milieu LIF
Utilisé pour cultiver les ES après la décongélation du 1^{er} stock d'ES.

Selon la technique établie au laboratoire, la suite de la culture des ES se fait traditionnellement sur feeders soit dans un milieu contenant du SVF-ES, soit dans un milieu contenant du KSR. Certains laboratoires continuent même la culture des ES dans le milieu 2i décrit plus haut (rare) ou dans l'un des deux milieux décrits ci-dessous supplémenté des deux inhibiteurs (plus commun) avec ou sans feeders selon les lignées.

• Exemple de Milieu avec SVF:

- 500 ml de DMEM Glutamax *(Life Technologies #31966-047)*
- 90 ml SVF-ES selon laboratoire
- 5 ml Pénicilline/Streptomycine (10000 units/ml et 10000 µg/ml respectivement) **OU** autre selon laboratoire
- 5 ml Acides aminés non essentiels 100X (optionnel)
- 600 µl BME 0,1M (0,1 mM final)
- 50 µl LIF (1000U/ml final) (LIF = Leukemia inhibitory factor, par exemple *Millipore #ESG1107*)

• Exemple de Milieu KSR:

- 500 ml de DMEM KO *(Life Technologies #10829018)*
- 90 ml KSR_KnockOut TM Serum Replacement *(Life Technologies #10828028)*
- 5 ml Pénicilline/Streptomycine 100X **OU** autre selon le laboratoire
- 5 ml Acides aminés non essentiels 100X (optionnel)
- 600 µl β Mercaptoéthanol 0.1M (0,1 mM final)
- 50 µl LIF (1000U/ml final) (LIF = Leukemia inhibitory factor, par exemple *Millipore #ESG1107*)

• Milieu de congélation

10% de DMSO + 90 % de SVF ou de KSR ou de milieu complet pour cellules ES.

A savoir : le milieu de congélation 10% de DMSO/90% SVF peut être conservé un mois à 4°C.

Les cellules sont congelées dans ce milieu et peuvent être conservées à -80°C durant la semaine suivant la congélation ou dans l'azote liquide pour une conservation à plus long terme.

Souris

Remarque générale: il est conseillé d'accoupler un mâle avec une seule femelle en Proestrus (voir plus bas) et de relever la présence ou non de bouchon vaginal le lendemain.

- pour la production de blastocystes

Souris mâles et femelles sont issus du (des) fond(s) génétique(s) et du/de(s) génotype(s) désiré(s) pour l'établissement des ES et sont âgés d'environ 7 à 20 semaines. Il est aussi possible d'obtenir des blastocystes en superovulant les femelles. Ceci permet d'obtenir les blastocystes plus facilement le jour précis souhaité mais nécessite (1) des femelles plus jeunes et (2) qu'un protocole de superovulation (non décrit ici) spécifique pour le fond génétique concerné soit mis en place au sein du laboratoire (autorisation d'expérimentation incluse).

- pour la production de feeders (uniquement si on ne veut pas acheter des feeders commerciaux)

Souris femelles et mâles de fond génétique CD1 (conseillé) ou C57BL/6 (également possible) âgés d'environ 7 à 20 semaines.

Procédure

1. Préparation des boîtes de culture avec feeders

Les fibroblastes embryonnaires (MEF) sont mis en culture à partir d'embryons au stade E13,5 puis sont traités à la mitomycine pour obtenir des feeders selon le protocole décrit dans Bryja *et al*, 2006.

Remarque : Il est aussi possible d'utiliser des feeders commerciaux (Il existe de nombreux fournisseurs de feeders, par exemple Global Stem, Applied Stemcell Inc ou Millipore).

Les feeders sontensemencés dans du milieu Fibro sur des boîtes de culture gélatinées à raison d'environ 34000 cellules/cm² pour tous les contenants sauf pour les plaques 24 puits (45000 cellules/cm²). L'objectif est d'obtenir un tapis cellulaire confluent à 100 % (monocouche sans espace entre les cellules). Les feeders sont mis en culture de préférence la veille ou au maximum 4 jours avant leur utilisation (les garder en culture à 37°C jusqu'à leur utilisation). Pour les boîtes de culture qui recevront les blastocystes en culture, il est préférable de mettre les feeders en culture la veille ou au maximum deux jours avant utilisation.

NB- Attention : Il peut arriver que 3 à 4 heures après décongélation, les cellules ne s'accrochent pas au fond de la boîtes et flottent toujours dans le milieu : ce sont des cellules mortes. Dans ce cas, changer le milieu le soir ou le lendemain pour les éliminer.

2. Production des embryons de souris au stade blastocyste

J-4 : Mettre les femelles en proestrus ou oestrus (Figure 1) en accouplement avec les mâles (un mâle avec une femelle)

J-3 : Le matin, isoler les femelles présentant un bouchon vaginal ou plug (Figure 1)



Figure 1 : Gauche : Souris en Proestrus. L'ouverture vaginale est gonflée, humide et bien rose. Il y a souvent des petites rides le long des bords dorsal et ventral. En stade Oestrus, l'ouverture sera plus grande mais moins rose et moins gonflée. **Droite** : Bouchon vaginal (=vaginal plug).

Pour plus de détails (photos des différents stades dans différents fonds génétiques), voir Byers *et al* 2012

3. Prélèvement et mise en culture des embryons en milieu 2i

J-1 : la veille, ou au **MAXIMUM 2 jours avant**, mettre en culture des feeders sur une **plaque 24 puits** ou des **boîtes 4 puits** gélatinée(s).

J0 : Mise en culture des embryons E3,5

- Changement du milieu de culture

Dans l'heure précédant la collecte des embryons, remplacer le milieu de culture des feeders (de la plaque 24 ou des boîtes 4 puits) par du milieu de culture 2i.

- Collecte et mise en culture des blastocystes (embryons à E3,5) :

- Mettre à mort les femelles selon la législation en vigueur et prélever les cornes utérines dans une boîte de Petri 35 ou 60 mm non gélatinée contenant du PBS 1X. Enlever le surplus de graisse puis transférer les cornes utérines dans une nouvelle boîte de 35 mm contenant du milieu de prélèvement (M2, CZB ou DMEM+FCS).
 - Récupérer les blastocystes par rinçage des cornes utérines avec le même milieu à l'aide d'une aiguille 26G montée sur une seringue de 1 ml puis les collecter à l'aide d'une « pipette bouche » (voir chap. matériels) ou d'une micropipette P10 ou P20 réglée sur 10µl.
 - Laver les embryons en les transvasant successivement dans 5 gouttes du milieu de prélèvement.
 - Déposer 1 blastocyste au centre de chaque puits avec feeders (contenant le milieu 2i).
- ATTENTION** : Ne pas bouger les boîtes durant 2 à 3 minutes afin que les blastocystes sédimentent.
- Bien vérifier à la loupe binoculaire qu'il y a bien UN seul et UNIQUE blastocyste par puits.
 - Incuber à 37°C en atmosphère humide à 5 % ou 7,5 % de CO₂ (selon laboratoire) (voir photo ci-après)

Idéalement, ne plus toucher aux boîtes pendant 48 heures : les embryons perdent en général leur zone pellucide et s'attachent aux feeders.

Les cellules dérivant de la masse cellulaire interne sont attachées aux feeders sous la forme d'une masse cellulaire compacte. Il faut laisser grossir cette masse jusqu'à une taille critique d'environ 100 µm de diamètre (voir photo ci-après). Par abus de langage, ces cellules seront appelées par la suite « ICM » dans ce protocole. Pendant cette période, il faut tenir compte non seulement du ratio ICM/ trophoblaste, mais aussi de la morphologie des cellules de l'ICM. Il faut également vérifier qu'il n'y a pas de contamination bactérienne/fongique. La dissociation de chaque ICM s'effectue en général de J5 à J10 après la mise en culture des blastocystes. Elle se fait en fonction de la taille de chaque ICM ainsi que de son accessibilité (par exemple, si ces cellules sont situées au-dessous de celles dérivées du trophoblaste, il est judicieux d'attendre plus longtemps avant dissociation pour leur laisser le temps d' « émerger » ce qui permettra de les atteindre plus facilement).

4. Dissociation des ICM

J4 à J9 : Préparer selon les besoins de nouvelles plaques 24 puits OU des boîtes 4 puits de feeders (avec milieu Fibro) qui permettront de recevoir les cellules des ICM après dissociation.

J5 à J10 : Jours de dissociation des ICM

- Changement de milieu :

Remplacer le milieu Fibro des feeders des boîtes 4 ou 24 puits receveuses par du **milieu 15%KSR (± 2%SVF)**

- Dissociation des ICM

Protocole 1 :

La dissociation des ICM est suivie en temps réel sous loupe binoculaire.

- Cette étape se fait sous loupe binoculaire de préférence sous hotte à flux laminaire.
- Pour chaque ICM devant être dissociée ce jour, préparer extemporanément une boîte de Petri non traitée pour la culture (par exemple une boîte de pétri bactériologique stérile) contenant une goutte de 5 µl de trypsine diluée au 1/2 dans du PBS et une goutte de 5 µl de SVF (voir figure 2).
- Etape 1 : Avec une micropipette (ou un capillaire siliconé étiré avec une étireuse) contenant un peu de trypsine aspirer l'ICM et la mettre dans la goutte de trypsine diluée, laisser agir environ 2 min puis terminer de dissocier l'amas de cellules par aspiration/refoulement.
- Etape 2 : Transférer les cellules dissociées dans la goutte de SVF (pour inactiver la trypsine).
- Etape 3 : Puis reprendre l'ensemble cellules + SVF et le transférer dans un puits de feeders en milieu KSR.

Recommencer l'opération pour chaque ICM en prenant soin de changer de capillaire entre chaque ICM.

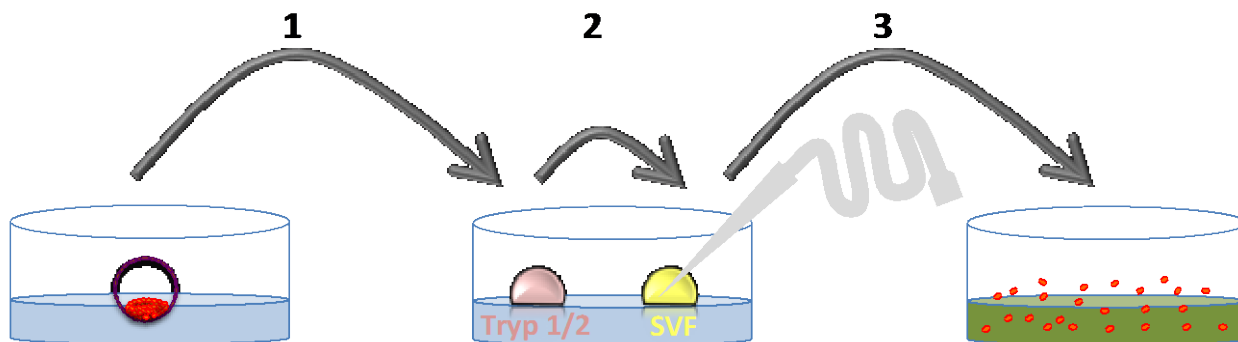


Figure 2 : Schéma de la dissociation des ICM

Les différentes étapes sont décrites dans le texte principal.

Protocole 2 :

- Préparer 1 plaque 96 puits avec 5 µl de trypsine diluée/ puits (autant de puits que d'ICM à dissocier ce jour).
- A l'aide de la pipette de collecte des embryons, transférer chaque ICM dans 1 puits de trypsine (changer de pipette à chaque embryon transféré).
- Vérifier à la loupe binoculaire que chaque ICM soit bien dans la goutte de trypsine.
- Laisser agir la trypsine quelques minutes soit à température ambiante soit dans l'incubateur à 37°C.
- Dissocier, avec une micropipette P20 (réglée sur 4 µl) l'ICM par aspiration/refoulement (20 fois).
- Visualiser au microscope si les cellules se sont bien individualisées.
- Transférer directement les cellules dissociées de chaque ICM dans le puits une plaque 24 puits avec feeders en milieu 15% KSR ($\pm 2\%$ SVF) (un puit par ICM).

Point essentiel : changer de capillaire (pipette de transfert) entre chaque ICM.

5. Entretien et passage des ES

- Changer le milieu 15%KSR ($\pm 2\%$ SVF) tous les jours.
- ATTENTION : Le premier repiquage devra se faire au plus tôt quand les cellules ES atteignent une confluence de 70%-80% (environ 4 à 5 jours) et au plus tard le 5^{ème} jour après dissociation de l'ICM (Voir photos).
- La dilution pour le premier repiquage varie en fonction de la confluence des cellules, selon les clones, les lignées et les laboratoires entre 1/1 (ré-étalement sur la même surface, très courant) et 1/5 (plus rare).
- Par la suite, il est important d'établir très rapidement (dans les 2 semaines suivantes) le rythme de repiquage habituel pour des cellules ES qui se fait en général tous les 48 heures quitte à faire des dilutions plus faibles.
- Penser à noter le nombre de passages et à congeler dès que possible (1^{er} et 2^{ème} passages). Il est d'usage de considérer que le passage 1 correspond à celui pour lequel les cellules sont cultivées pour la première fois sur boîte de culture de 35 mm de diamètre.
- Il est possible de passer rapidement du milieu KSR 15 % ($\pm 2\%$ SVF) au milieu de culture des ES, choisi et validé par votre laboratoire.

Point essentiel : il est recommandé de faire un test de culture en milieu ES sur un échantillon de cellules ES pendant quelques passages avant de passer l'ensemble de vos lignées en milieu ES. En effet en fonction des lignées, un SVF testé pour une lignée peut ne pas convenir à une autre lignée d'ES.

6. Exemple d'évolution des embryons au cours de l'établissement d'une lignée de cellules ES

Dans [l'annexe 1a](#) vous pouvez suivre l'évolution de 3 blastocystes et de leur ICM de fond C57BL/6N.

Contrôles qualité

Que les nouvelles lignées de cellules ES soient destinées à mener des expériences de transgénèse ciblée (génération de souris KO/KI, après recombinaison homologe et injection des blastocyste) ou destinées à étudier *in vitro* le phénotype d'une lignée KO, plusieurs contrôles qualité sont à réaliser. Chaque laboratoire choisira celui / ceux qui lui semble(nt) les plus relevant(s) dans son cas.

Parmi eux :

- **Vérification de l'absence de mycoplasmes dans les cellules**
- **Génotypage et/ou sexage par PCR**
- **Numération chromosomique**
- **Vérification de la transmission à la lignée germinale**

Ces différents contrôles sont détaillés en annexe Ib.

Références

Bryja V, Bonilla S, Cajánek L, Parish CL, Schwartz CM, Luo Y, Rao MS, Arenas E (2006). An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 24, 844-849

Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., McLay, R., Hall, J., Ying, Q. and Smith, A. (2008). Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 135, 1287-1298.

Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA (2012). Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS ONE* 7(4): e35538

Evans, M. J. and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.

Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., Yan, Y., Maxson, R. E., Schulze, E. N., Song, H., Hsieh, C. et al. (2008). Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 135, 1299-1310.

Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7634-7638.

Nichols, J. and Smith, A. (2009). Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4, 487-492.

Ying, Q.L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., and Smith, A (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture *Nat. Biotechnol.* 2003; 21: 183–186

Ying, Q., Wray, J., Nichols, J., Battle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P. and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519-523.

1. ANNEXES Ia : Etablissement de cellules ES à partir d'embryons C57BL/6N

Nous avons pris des photos des puits de culture tous les jours afin de suivre l'évolution des cultures. La mise au point a été faite sur l'ensemble [blastocystes/ ICM/ES].

La culture se fait sur feeders. Ils ne sont parfois pas très visibles sur les photos mais ils sont toujours en tapis bien dense.

A. Evolution de l'embryon n°5 qui aboutira à l'établissement d'une lignée d'ES

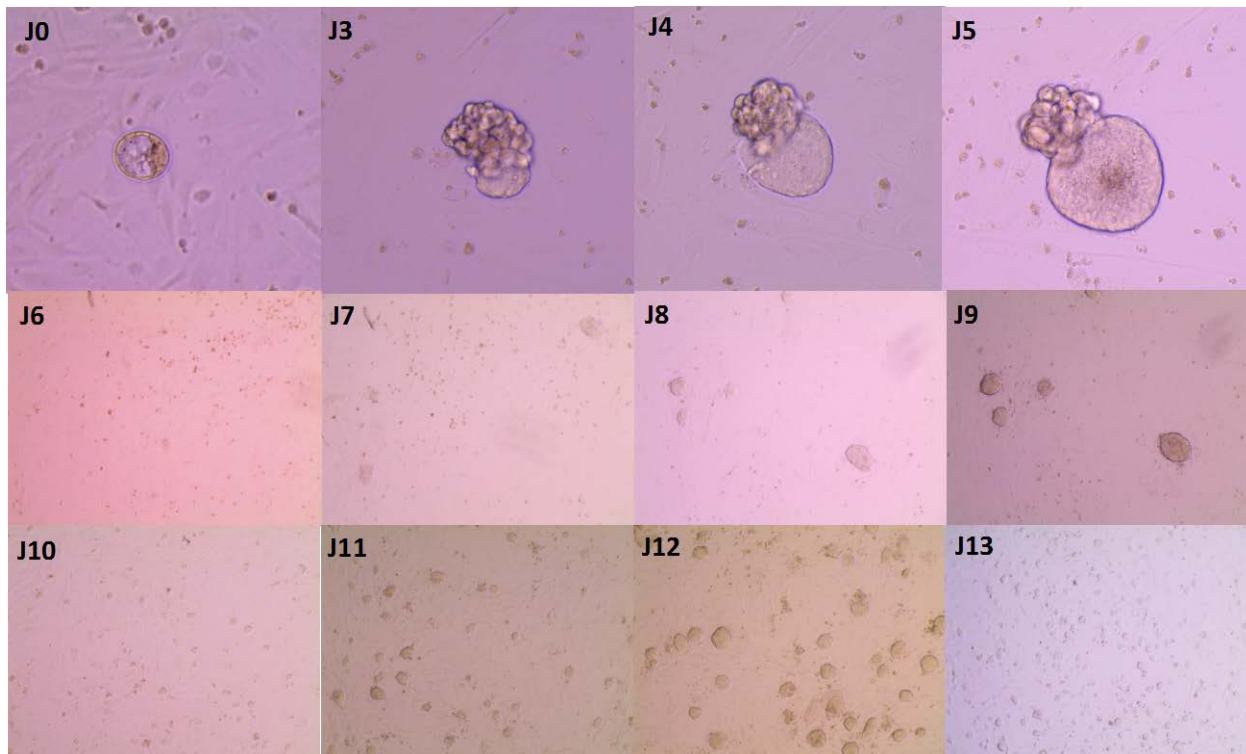


Figure 3 : Evolution de l'embryon n°5 qui aboutira à l'établissement d'une lignée d'ES

(Photos réalisées à l'ICS - Grossissement x20 pour J0 à J5, puis grossissement x10)

J0 : Joli blastocyste avec sa membrane pellucide (halo bleuté autour du blastocyste) et son blastocoèle bien visible.

J1 et J2 (non montrés) : Les blastocystes sont laissés dans l'incubateur (pas d'observation pour ne pas décrocher les embryons des feeders).

J3 : Comme attendu, l'embryon a perdu sa pellucide et s'est attaché aux feeders. Une petite ICM bien ronde est observable en bas.

J4 : Belle ICM en bas à droite

J5 : Le centre de l'ICM commence à « noircir ». L'ICM est dissociée le jour même ; les cellules sont mises en culture dans une plaque 4 puits avec du milieu KSR sans SVF (une ICM par puits).

J6 : Le lendemain de la dissociation de l'ICM. Culture sur feeders dans du milieu KSR sans SVF. Colonies discrètes et peu nombreuses. Changement de milieu.

J7 : Deux jours après dissociation de l'ICM, il y a très peu de colonies, mais elles présentent une morphologie typique de colonies ES (colonies rondes, bombées avec des bords nets). La culture se poursuit avec un changement de milieu.

J8 : Changement de milieu.

J9 : Les colonies commencent à devenir granuleuses sur le dessus. Repiquage et passage sur surface identique (d'un puits d'une plaque 4 puits à un autre).

J10 : Un jour après le premier repiquage sur surface de même taille. Les colonies sont plus nombreuses. Changement de milieu.

J11 : Deux jours après le premier repiquage. Les colonies ont la morphologie attendue (pas de granulation) et ne sont pas confluentes.

Changement de milieu.

J12 : Repiquage d'un puits d'une plaque 4 puits sur une boîte de culture de 3,5 cm. Passage numéro 1 pour commencer à imposer le rythme de passage souhaité.

J13 : Visuellement, le nombre de colonies souhaitées/cm² est atteint. Le prochain repiquage sera fait le lendemain (passage d'une boîte de 3,5 cm sur 3 boîtes de 3,5 cm).

B. Evolution de l'embryon n°4 qui aboutira à l'établissement d'une lignée d'ES

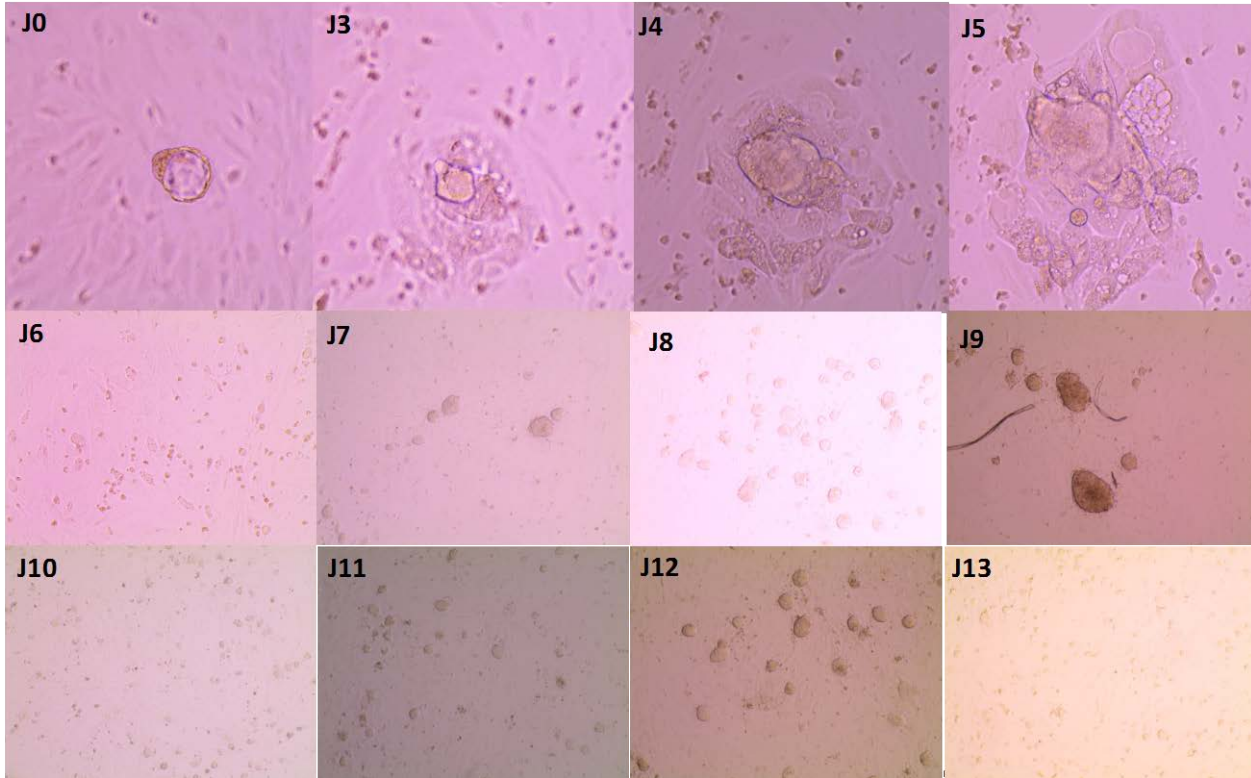


Figure 4 : Evolution de l'embryon n°4 qui aboutira à l'établissement d'une lignée d'ES

Photos réalisées à l'ICS - Grossissement x20 pour J0 à J6, puis grossissement x10

Bien qu'au moment de la mise en culture (J0), le blastocyste semble déjà avoir perdu sa membrane pellucide, à J3 nous pouvons observer l'émergence d'une petite ICM (zone bien réfringente en haut à gauche) qui se développe à J4 en une belle ICM entouré d'un trophoblaste très étalé.

La dissociation de l'ICM se fait à J5 (le trophoblaste semble différencié mais pas l'ICM).

Après un passage en milieu KSR sans SVF, les colonies discrètes à J6 acquièrent une belle morphologie de colonies d'ES à J7, puis elles sont repiquées à J8 sur la même surface.

A J12 un repiquage d'un puit d'une plaque 4 puits sur 2 puits d'une plaque 4 puits (dilution 1/2) est réalisé pour commencer à imposer le rythme de passage souhaité.

Enfin à J13, visuellement, le nombre de colonies souhaitées/cm² est atteint. Le prochain repiquage sera fait deux jours plus tard et les cellules seront mises en culture sur 2 boîtes de 3,5 cm.

C. Exemple d'une lignée non aboutie



Figure 5 : Exemple d'une lignée non aboutie

Photos réalisées à l'ICS - Grossissement x20

J0 : Blastocyste en train de perdre sa membrane pellucide.

J1 et J2 (non montré): Les blastocystes sont laissés dans l'incubateur (pas d'observation pour ne pas décoller les embryons).

J3 : Toute petite ICM en haut.

J4 : L'ICM ne se développe pas ou est cachée par le trophoblaste.

J5 : L'ICM ne se développe pas.

J6 : L'ICM n'évoluera plus et sera trop difficile à récupérer. La culture est stoppée.

2. Annexe Ib : Contrôles qualité

A. Vérification de l'absence de mycoplasmes dans les cultures

Pourquoi le faire ?

Il est important de s'assurer, dès les passages précoces, que les cellules sont exemptes de mycoplasmes car leur présence peut les rendre plus fragiles et donc plus difficiles à cultiver. (La présence de mycoplasmes peut également et ultérieurement empêcher la réussite de protocoles de différenciation. Il est d'usage de vérifier régulièrement l'absence de mycoplasmes pour détecter au plus vite toute contamination naissante (provenant soit d'autres cellules cultivées sous la même PSM, dans le même incubateur soit des milieux/feeders).

Plusieurs kits pour tester la présence de mycoplasmes existent (PCR Minerva Biolabs, VenorGEM, Plasmotest...). Pour obtenir un résultat fiable, cultiver les cellules dans un milieu sans antibiotiques. Les tests sont faits sur lysat cellulaire.

B. Génotypage et/ou sexage des cellules ES par PCR

Pourquoi le faire ?

- Pour connaître le génotype de vos ES car elles sont issues d'un croisement où plusieurs génotypes possibles sont attendus dans la descendance.
- Dans le cadre d'une utilisation de vos ES pour faire des souris transgéniques pour savoir si des chimères mâles ou femelles sont attendues (par commodité de croisement des chimères, il est d'usage d'utiliser uniquement des ES mâles pour obtenir un maximum de chimères mâles (après micro-injection dans des blastocystes receveurs) qui pourront ensuite être croisées avec plusieurs femelles en parallèle).
- Si vous avez besoin de connaître le sexe de vos cellules ES ou pour toute autre raison scientifique.

Informations importantes : En vue d'un génotypage/sexage, il est préférable de cultiver les ES sans feeders, pour éviter une contribution trop importante de ces derniers ce qui rendrait l'interprétation plus difficile voire impossible. Un culot cellulaire (en général récupéré d'une boîte de 35 mm de diamètre d'ES sur gélatine à confluence) est lysé pendant plusieurs heures dans un tampon contenant de la protéinase K puis incubé à 95°C pour inactiver cette dernière. Ce lysat pourra servir de matrice dans votre protocole classique de génotypage pour déterminer le génotype de chaque lignée ES. Il peut être judicieux si les PCR ne fonctionnent pas sur lysats de purifier l'ADN par une extraction phénol/chloroforme suivi d'une précipitation à l'éthanol puis d'une resuspension de l'ADN purifié dans de l'eau ou du Tris. Ce traitement permet non seulement d'enlever les potentiels inhibiteurs de la Taq polymérase contenus dans le lysat brut mais également de déterminer de façon plus précise la concentration en ADN. Cela permettra d'adapter la quantité à ajouter par PCR (en général 25 à 100 ng d'ADN génomique par réaction de PCR). Lors de l'interprétation des résultats de PCR, toujours prendre en compte une possible contamination de l'ADN WT issu des feeders inévitablement encore présents.

Remarque sur la PCR de sexage:

- Le protocole de PCR décrit dans la Figure 6 peut être réalisée sur cellules lysées et digérées par la protéinase K ou sur ADN purifié.

- Le couple SRY ne détecte que le chromosome Y (partie spécifique à l'Y)

- Le couple smc amplifie une portion du Chromosome X et une portion du Chromosome Y sauf que la différence de paires de bases est si petite qu'il est conseillé de migrer longtemps pour distinguer les 2 bandes (Selon [Langa F.](#) 2000).

- Cependant cette double PCR permet d'avoir assez rapidement la réponse mâle ou femelle sans attendre trop longtemps que les bandes smc se séparent (bandes SRY et double bande smc confondues pour les femelles et seulement la bande SRY pour les mâles).

A Primers :

Couple primers 1		Couple primers 2	
Smc1	TGA-AGC-TTT-TGG-CTT-TGA-G	SRYF	GAA-TTC-ATA-TAT-ATG-ACA-GAG-GCA
Smc2	CCA-CTG-CCA-AAT-TCT-TTG-G	SRYR	CCA-TTC-CCT-TCA-AAT-ATC-ATA-CT

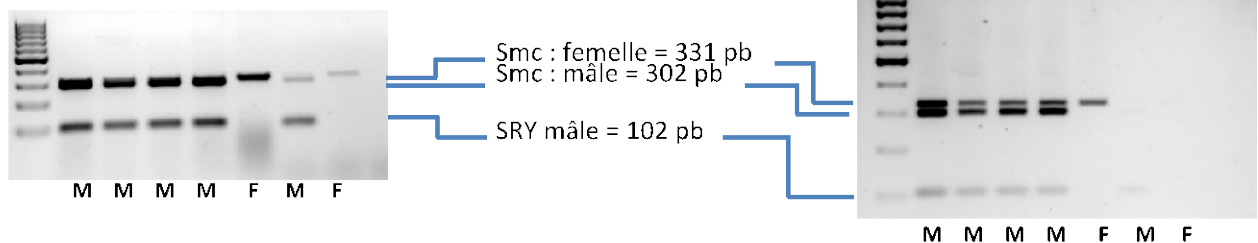
B Mix PCR :

	Volume (µl)
Tampon Green Taq 10X	2,5
Smc1 (10 µM)	0,5
Smc2 (10 µM)	0,5
SRYF (10 µM)	0,25
SRYR (10 µM)	0,25
dNTP (10 mM)	0,75
H2Omq	18
Dream Taq green 5UI/µl	0,25
ADN (qsp 50 à 100 ng)	2

C Programme PCR :

Temp	cycle	
94°C	3 min.	
94°C	30 s	
50°C	30 s	} X 35
72°C	45 s	
72°C	10 min.	
12°C	∞	

D Migration sur un gel d'agarose à 2 %



M : Mâle
F : Femelle

Figure 6 : PCR de sexage

A : couple de primers utilisés – B : mix PCR pour une réaction utilisant la DreamTaq Green DNA Polymerase (Life Technologies #EP0711) – C : programme PCR – D : photo du gel de migration des produits de PCR.

C. Numération chromosomique de cellules ES

Pourquoi le faire ?

- Il est essentiel de vérifier que la/les lignées ES que vous avez générée(s) a/ont bien 40 chromosomes acrocentriques. En effet, une lignée ES avec un caryotype anormal a très peu de chance de coloniser la lignée germinale de la chimère et donc de donner une GLT (germline transmission). Même si ces lignées ES serviront uniquement pour un phénotypage cellulaire (par exemple différenciation en divers types cellulaires), il est là aussi important de vérifier qu'elles ont un caryotype normal (pour éviter de confondre l'effet de votre mutation/gène d'intérêt avec l'effet d'une aberration chromosomique).

- Le caryotype d'une lignée cellulaire peut évoluer au fil des passages. Si le fait d'avoir un caryotype normal est un critère de votre projet, et si vous êtes amené à utiliser plusieurs fois ces cellules ES (plusieurs expériences de mutagenèse, plusieurs expériences de différenciation...), il est d'usage de vérifier que le caryotype reste globalement stable au cours différents des passages que cette lignée subira. Sélectionner la/les lignées avec un caryotype stable diminuera ainsi la probabilité d'avoir un nombre important d'expériences invalidées pour cause de caryotype anormal.

- Il est fortement conseillé d'effectuer une numération chromosomique avant chaque expérience clé (par exemple après une amplification au moment de la congélation d'un grand nombre de tubes stocks, juste avant une différenciation, juste avant une injection, ...).

Limitations

Le protocole décrit plus bas permet uniquement de compter le nombre de chromosomes et de vérifier que les chromosomes sont tous acrocentriques. Un comptage de 40 chromosomes acrocentriques n'est pas toujours équivalent à « $2n=40$ ». En effet, ce protocole ne permettant pas de reconnaître précisément chaque chromosome, il ne permet pas de détecter les cas de caryotypes anormaux avec une trisomie d'un chromosome associée à la monosomie d'un autre ou les cas de translocations maintenant des chromosomes acrocentriques.

Informations importantes :

- Toujours garder en tête qu'une lignée cellulaire peut évoluer et qu'une lignée avec 40 chromosomes acrocentriques peut au cours des passages modifier son patrimoine génétique. Il est fortement conseillé de revérifier régulièrement le nombre et la morphologie des chromosomes.
- Il est important que les cellules soient en phase de croissance lorsque la colcémide (=arrêt des cellules en métaphase) est ajoutée dans le milieu de culture. Pour cela, les cellules sont en général repiquées la veille sur une boîte de culture 6 cm gélatinée sans feeder.
- La position du bain-marie dans la pièce est cruciale pour obtenir une bonne hygrométrie (circulation de l'air jouant sur l'étalement).
- La coloration utilisée dans ce protocole est celle du GIEMSA car elle permet la lecture des lames sur un microscope standard. Il est également possible, si l'on possède un microscope à fluorescence de colorer les métaphases au DAPI ou Hoescht.

1. Traitement à la colcémide (arrêt des cellules en métaphase) :

- Changer le milieu de la boîte à traiter, ce qui permet de réactiver la croissance cellulaire.
- Environ 2 à 3 heures plus tard, ajouter la colcémide au milieu de culture à une concentration finale de 0,02 µg/ml. Par exemple, 8 µl d'une solution stock à 10 µg/ml (Sigma D-1925) pour 4 ml de milieu.
- Incuber 2 heures dans l'incubateur à CO₂.
- Laver 1 fois avec PBS 1X.
- Trypsiner et récolter les cellules dans un tube à fond conique avec du milieu contenant 5 à 10 % de SVF (pour inactiver la trypsine).
- Centrifuger 5 min à 300-350 g à T°C ambiante.
- Aspirer le surnageant.

- Tempérer le bain-marie à environ 50°C

2. Choc hypotonique :

- Ajouter 1 ml de KCl 0,56% sur le culot de cellules ES. Agiter à vitesse lente, puis rajouter 5 ml de KCl et agiter à nouveau.
- Incuber 20 min à environ 37°C dans l'incubateur.

3. Fixation :

Sous une sorbonne,

- Préparer le fixateur **juste avant emploi** : méthanol-acide acétique 3V/1V.
- Rajouter lentement 8 à 10 gouttes de fixateur avec une pipette Pasteur et mélanger une fois par retournement.
- Centrifuger 5 min à 300-350g.
- Aspirer le surnageant.
- Tout en agitant à faible vitesse, ajouter environ 2 ml de fixateur, goutte à goutte avec une pipette Pasteur, puis compléter à 6 ml.
- Laisser reposer 20 min à température ambiante.

- Centrifuger 5 min à 300-350g, aspirer surnageant.
- Reprendre le culot dans 6 ml de fixateur tout en agitant, centrifuger 5 min à 300-350g, aspirer.
- Répéter jusqu'à **3X** cette dernière étape (le nombre de répétitions dépend de la taille du culot et de la présence de débris dans l'échantillon).

4. Étalement :

- Déposer au-dessus du bain-marie à environ 50°C des lames sèches, propres et annotées.
- Reprendre le culot dans environ 500 µl de fixateur et avec 1 pipette Pasteur laisser tomber environ 3 gouttes de la suspension par lame d'une hauteur d'environ 20 cm.
- Laisser sécher et observer au microscope la qualité de la préparation.
- Si la concentration cellulaire est trop importante, diluer à nouveau le culot, et si les cellules sont trop diluées re-centrifuger et reprendre le culot dans un volume inférieur et recommencer l'étalement.
- Sélectionner au microscope au contraste de phase (objectif X20) les lames qui seront colorées.

NB : L'étape d'étalement est cruciale, certains jours, les conditions de travail (ex: hygrométrie), ne permettent pas un bon étalement des chromosomes. Il est alors préférable de recommencer l'étape d'étalement un autre jour. Pour cela, conserver au réfrigérateur le culot cellulaire dans le fixateur (conservation plusieurs jours à +4°C) puis avant de faire l'étalement, laver une fois le culot dans du fixateur préparé extemporanément et réaliser l'étalement comme décrit précédemment.

5. Coloration :

- Colorer les lames au Giemsa 4% pendant 10 min) par exemple dans des cuves de Coplin.
- Faire juste un court lavage à l'eau froide avant de sécher les lames.
- Monter sur une lamelle avec du Pertex[™] ou équivalent.

6. Lecture :

- Sélectionner une métaphase bien étalée et isolée.
 - Compter le nombre de chromosomes présents et observer leur morphologie.
- La présence d'un ou plusieurs chromosomes non acrocentriques est le résultat d'une translocation et doit bien être distinguée du cas où deux chromosomes acrocentriques sont si proches l'un de l'autre qu'ils peuvent donner l'impression d'en faire qu'un seul. Pour distinguer entre ces deux possibilités, il faut faire varier la vis micrométrique du microscope.
- Pour un clone ES de souris, le nombre de chromosomes acrocentriques attendu par métaphase est 40 (caryotype euploïde).
- Il est conseillé de lire 30 métaphases réparties sur au moins deux lames.

7. Interprétation :

- Calculer le % de métaphases avec 40 chromosomes acrocentriques.
 - Calculer également le % des autres occurrences.
- Dans la majorité des cas, il y aura une ou plusieurs autres occurrences, le nombre/fréquence de celles-ci augmentant en général avec le nombre de passages.

C'est à chaque laboratoire de déterminer par lignée cellulaire et par type d'application quel est le pourcentage minimal de n=40 acceptable. Le seuil acceptable sera par exemple beaucoup plus bas pour des cellules à haut passage juste avant injection ou analyse phénotypique que pour des cellules à petit passage venant juste d'être dérivées. Si plusieurs lignées sont disponibles, toujours favoriser celle(s) avec le % de n=40 le plus élevé. Si la lignée doit être cultivée encore pendant plusieurs passages, éviter les lignées possédant des trisomies (qui donnent souvent un avantage sélectif à ces cellules qui prennent alors très vite le dessus sur les cellules avec un caryotype normal). Pour des cellules C57BL/6 juste avant injection, un seuil de 50% de n=40 peut être acceptable si aucun autre clone n'est disponible, un seuil minimum de 70% représente une sécurité.



Figure 7 : Photos de plaques métaphasiques

A : Caryotype euploïde à 40 chromosomes acrocentriques (coloration au Giemsa)

B : Caryotype anormal présentant une translocation (flèche rouge, coloration au Giemsa)

C : Caryotype euploïde à 40 chromosomes acrocentriques (coloration au DAPI)

D. Vérification de la pluripotence *in vitro*

Pour vérifier le caractère pluripotent des cellules ES *in vitro*, différents marqueurs peuvent être utilisés :

- Expression de la Phosphatase alcaline (PAL)
- Oct4, SSEA1, REX1,
- etc....

E. Vérification de la transmission à la lignée germinale (GLT, GermLine Transmission)

Pourquoi le faire ?

Cela représente un critère de choix entre plusieurs lignées qui se comportent de manière équivalente lors des tests précédents. Si la lignée ES à sélectionner doit servir pour créer de nombreuses souris transgéniques (transgénèse ciblée par recombinaison homologue dans les ES puis injection dans des blastocystes hôtes), il est intéressant d'évaluer grossièrement si cette lignée ES permettra d'avoir une bonne GLT. En effet, à nombre de blastocystes injectés équivalents, plus le nombre de chimères mâles et leur taux de chimérisme (voir « scorage » plus bas) sont grands, plus grande sera la chance d'avoir une bonne GLT. Par conséquent le nombre de blastocystes à injecter avec les clones transgéniques issus de cette lignée ES performante pourra être réduit.

Information importante : détermination du pourcentage de chimérisme

Les souris chimériques ou chimères, obtenues par la microinjection de cellules ES dans des embryons hôtes, sont constituées à la fois de cellules dérivées des cellules ES et de cellules dérivées de l'embryon hôte. Dans la majorité des cas, et dans le but de faciliter la détermination du pourcentage de chimérisme, il est courant d'utiliser des cellules ES et des embryons hôtes provenant de fonds génétique murins présentant des couleurs pelage différentes. Ainsi, en évaluant visuellement la proportion des deux couleurs du pelage, il est facile d'évaluer la contribution des cellules ES dans la phase du développement embryonnaire. La contribution des cellules ES s'exprime en pourcentage, c'est le pourcentage de chimérisme.

Chaque zone du corps de la souris compte pour un maximum de:

- Ventre : 50% (incluses les parties ventrales des pattes) ;
- Dos : 20% (exclues les pattes et la tête) ;
- Flancs (incluses les parties dorsales des pattes) : 10% par flanc soit 20% au total ;
- Tête : 10%.

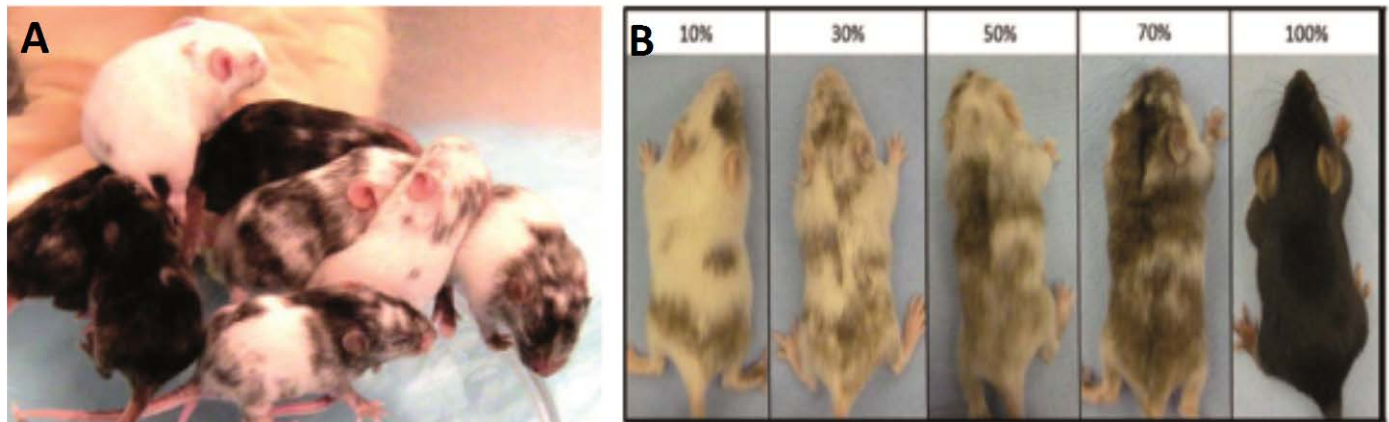


Figure 8 : Détermination du pourcentage de chimérisme

A- Exemple d'une portée de souris chimères.

B- Exemples de différents pourcentages de chimérisme (cellules ES de fond C57BL/6 injectées dans des blastocystes de souris BALB/c)

Lors des premières utilisations de cellules ES, il est conseillé d'injecter des cellules ES « WT » (sans nouvelle modification génétique) dans des blastocystes hôtes issus de souris de couleur différente de celle dont sont dérivés les cellules ES et de réaliser une première évaluation du taux de transmission à la lignée germinale (GLT). Pour cela il faut analyser dans un premier temps le nombre de chimères obtenues et le pourcentage de chimérisme (grâce au scorage). En effet plus la contribution des ES à la couleur du pelage des chimères est grande, plus la chance qu'elles aient contribuées également à la lignée germinale de la chimère est grande (Figure 8). En croisant les chimères avec des souris WT, il est possible dans un deuxième temps de déterminer le nombre de chimères qui transmettent le patrimoine génétique des ES à leur descendance (en se basant sur la couleur du pelage).