

|                                                                                                                                     |                                                                                       |                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <br><b>Plateforme</b><br><b>Electrophysiologie</b> | <b>Mode opératoire</b>                                                                | Réf :<br>MO_OVOCYTES_AQUA                  |
|                                                                                                                                     | <b>Préparation des ovocytes , injection d'ARN et mesure de perméabilité osmotique</b> | Version 2<br>date : 19 12 2017<br>page 1/2 |

## 1. Objet et domaine d'application

Préparation des ovocytes , injection d'ARN et mesure de perméabilité osmotique

## 2. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

## 3. Personnes référentes

C Tournaire

## 4. Hygiène et sécurité

## 5. Contenu du mode opératoire

### Préparation des ovocytes :

Nettoyer les instruments à l'alcool avant l'opération

Endormir le xénope (Xenopus laevis) par diminution progressive de sa température corporelle (environ **30 min dans la glace** dans un bac avec couvercle).

**Inciser au bas de l'abdomen la peau puis le muscle sous-jacent** pour atteindre directement les ovaires de l'animal. Un ou deux lobes ovariens sont extraits de l'organisme et sectionnés. Le muscle et la peau sont recousus chacun à l'aide de 3 points de suture avec du fil résorbable. Rincer la plaie avec du Ringer stérile avant et pendant la suture.

- **Recueillir les fragments d'ovaire dans OR2**
- **Disséquer avec des pinces fines en petits amas d'une vingtaine d'ovocytes.** Rincer plusieurs fois avec OR2.
- **Incuber une heure à 20 °C sous faible agitation dans 20 ml de milieu OR2 + 2 U/ml de collagénase A (Roche).**

**NB :** lorsque l'on arrête la digestion, les ovocytes ne sont pas libérés des follicules. Il faut attendre la fin du traitement dans le tampon K (hypertonique) pour que les ovocytes soient dissociés.

- **Rincer plusieurs fois dans OR2 contenant 1 mg/ml de SAB, ( au moins 5 fois, 200 ml au total)**

|            | Rédacteur           | Vérificateur | Approbateur                                     |
|------------|---------------------|--------------|-------------------------------------------------|
| Nom :      | C Tournaire         |              |                                                 |
| Fonction : | Référent Expression |              |                                                 |
| Visa :     | hétérologue AQUA    |              | <i>C Tournaire</i><br><i>Animatrice qualité</i> |

|                                                                                                                                     |                                                                                       |                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <br><b>Plateforme</b><br><b>Electrophysiologie</b> | <b>Mode opératoire</b>                                                                | Réf :<br>MO_OVOCYTES_AQUA                  |
|                                                                                                                                     | <b>Préparation des ovocytes , injection d'ARN et mesure de perméabilité osmotique</b> | Version 2<br>date : 19 12 2017<br>page 2/2 |

- **Transférer dans le tampon K** (sous très faible agitation pendant 1 heure . Toutes les 15 min faire passer les ovocytes dans une pipette (plastique souple dont l'extrémité a été coupée) pour faciliter leur dissociation. **Changer le milieu K à 30 min.**
- **Rincer les ovocytes avec du Barth's plus 0.1 g / 100 ml de BSA**

A ce stade, les ovocytes sont individualisés et maintenus dans du milieu **Barth's + gentamycine (1 mg /l)**.

**Ils sont triés suivant leur taille et leur coloration** (forme sphérique, pôle animal et végétatif bien caractérisés). Seuls les ovocytes intacts des stades terminaux (V et VI ) sont conservés pour l'injection et sont maintenus dans du milieu Barth's à 19 °C une nuit avant injection.

### **Injection des ARNc:**

- **Pour l'injection**, on utilise une micro-pipette de verre étirée pour obtenir un diamètre de pointe de l'ordre de 10 µm (voir protocoles de patch-clamp et voltage -clamp pour la préparation des micro-pipettes). Cette micro-pipette est montée sur un micro-injecteur (nanoject II, Drummond)
- L'ensemble est fixé sur un micromanipulateur. L'injection se fait sous loupe binoculaire, par application de la micro-pipette de verre à la surface de l'ovocyte immobilisé au fond d'une boîte de pétri, perforation de la membrane et injection contrôlée de 50 nl (soit 1/20<sup>e</sup> du volume de l'ovocyte) de solution d'ARNc.

### **- Mesure de transport d'eau par vidéo-microscopie**

L'activité de transport d'eau est mesurée deux à trois jours après l'injection. Elle est calculée à partir des enregistrements des variations de volume de l'ovocyte soumis à un choc hypo-osmotique pendant 1 ou 2 min.

### **Choc hypo-osmotique :**

- Placer l'ovocyte injecté (à l'aide d'une pipette en plastique souple) dans une solution de Barth's diluée 5 fois avec de l'eau sous la loupe binoculaire.
- Le gonflement cellulaire qui résulte de ce traitement hypotonique est suivi à l'aide de la caméra interfacée avec un micro-ordinateur. L'acquisition et le traitement des images sont réalisés à l'aide d'un logiciel ImageJ qui permet de suivre l'évolution de

|                               | Rédacteur                                              | Vérificateur | Approbateur                                     |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------|-------------------------------------------------|
| Nom :<br>Fonction :<br>Visa : | C Tournaire<br>Réfèrent Expression<br>hétérologue AQUA |              | <i>C Tournaire</i><br><i>Animatrice qualité</i> |

|                                                                                                                                     |                                                                                       |                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <br><b>Plateforme</b><br><b>Electrophysiologie</b> | <b>Mode opératoire</b>                                                                | Réf :<br>MO_OVOCYTES_AQUA                  |
|                                                                                                                                     | <b>Préparation des ovocytes , injection d'ARN et mesure de perméabilité osmotique</b> | Version 2<br>date : 19 12 2017<br>page 3/2 |

la surface projetée (S) des ovocytes au cours du temps. Une mesure est réalisée toutes les 10 ou 20s. Les données sont transposées sous le logiciel Excel , ce qui permet d'obtenir une mesure à un instant donné du volume V des ovocytes, considérés comme sphériques. La vitesse relative de gonflement des ovocytes ( $dV/V_0/dt$ ) permet de calculer la perméabilité de la membrane de l'ovocyte :

$$Pf = V_0 \cdot (d(dV/V_0)/dt) / S \cdot V_w \cdot \Delta C$$

où S est la surface de l'ovocyte (0.045 cm<sup>2</sup>),  $V_w$  le volume molaire de l'eau (18 cm<sup>3</sup>/ mol) et  $\Delta C$  le gradient d'osmolarité (160 mosm) de part et d'autre de la membrane de l'ovocyte.

|                               | Rédacteur                                              | Vérificateur | Approbateur                       |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Nom :<br>Fonction :<br>Visa : | C Tournaire<br>Réfèrent Expression<br>hétérologue AQUA |              | C Tournaire<br>Animatrice qualité |

|                                                                                                                                     |                                                                                       |                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <br><b>Plateforme</b><br><b>Electrophysiologie</b> | <b>Mode opératoire</b>                                                                | Réf :<br>MO_OVOCYTES_AQUA                  |
|                                                                                                                                     | <b>Préparation des ovocytes , injection d'ARN et mesure de perméabilité osmotique</b> | Version 2<br>date : 19 12 2017<br>page 4/2 |

### Solutions :

#### Barth's

|                                                        | mM   | pesée pour 1 l de solution 10X (g) |
|--------------------------------------------------------|------|------------------------------------|
| NaCl                                                   | 88   | 51,43                              |
| KCl                                                    | 1    | 0,75                               |
| NaHCO <sub>3</sub>                                     | 2,4  | 2,03                               |
| Hepes                                                  | 10   | 23,83                              |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O | 0,33 | 0,775                              |
| CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O                 | 0,41 | 0,6                                |
| MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O                  | 0,82 | 2,03                               |

Ajuster le pH à 7,4 avec NaOH 1M puis autoclaver. Ajouter 1 ml de gentamycine par litre de solution avant utilisation.

#### Ringer

|                                        | mM  | pesée pour 1 l de solution 10X (g) |
|----------------------------------------|-----|------------------------------------|
| NaCl                                   | 115 | 67,2                               |
| KCl                                    | 2,5 | 1,86                               |
| CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O | 1,8 | 2,65                               |
| NaHCO <sub>3</sub>                     | 1   | 0,84                               |
| Hepes                                  | 10  | 23,83                              |
| MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O  | 1   | 2,03                               |

Ajuster le pH à 7,4 avec NaOH 1M puis autoclaver

#### OR2

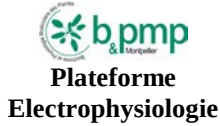
|                                       | mM   | pesée pour 1 l de solution 10X (g) |
|---------------------------------------|------|------------------------------------|
| NaCl                                  | 82,5 | 48,21                              |
| KCl                                   | 2    | 1,5                                |
| Hepes                                 | 5    | 11,915                             |
| MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O | 1    | 2,03                               |

Ajuster le pH à 7,5 avec NaOH 1M puis autoclaver

#### Solution K

|                                                      |        |          |
|------------------------------------------------------|--------|----------|
| <b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3H<sub>2</sub>O</b> | 100 mM | 22,8 g/l |
|------------------------------------------------------|--------|----------|

Ajuster le pH à 6,5 avec HCl, puis ajouter 1g/l de BSA. Conserver à -20 °C

|                                                                                   |                                                                                           |                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
|  | <b>Mode opératoire</b>                                                                    | Réf :<br>MO_OVOCYTES_AQUA                  |
|                                                                                   | <b>Préparation des ovocytes , injection d'ARN et<br/>mesure de perméabilité osmotique</b> | Version 2<br>date : 19 12 2017<br>page 5/2 |