

Master 1 Biologie Santé

UE « Méthodes d'investigation en recherche : modèles intégrés »

TD « Manipulation des animaux »



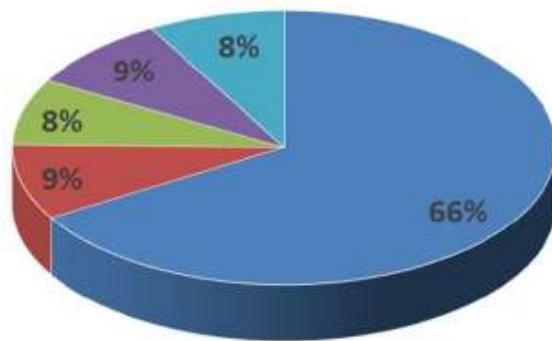
Mme DHENNIN-DUTHILLE Isabelle
isabelle.dhennin@u-picardie.fr



Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire EA4667

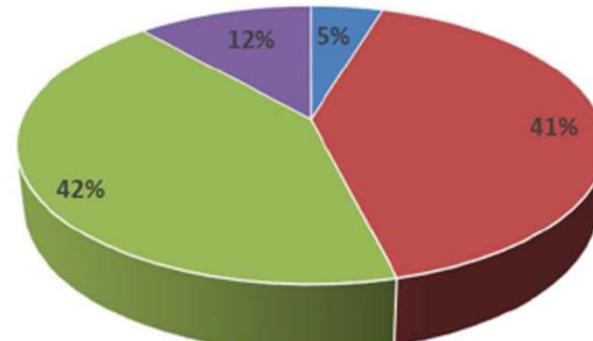
Utilisation d'animaux à des fins scientifiques dans les établissements français
– Enquête statistique 2022 –

1 - Espèces ou types d'animaux



- Souris
- Lapins
- Rats
- Poissons zèbres et autres poissons
- Autres espèces

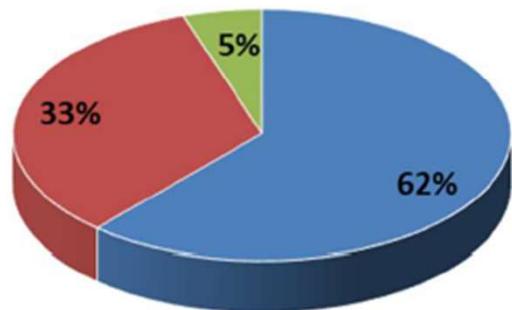
5 – Niveau de gravité des procédures



- Sans réveil
- Légère
- Modérée
- Sévère

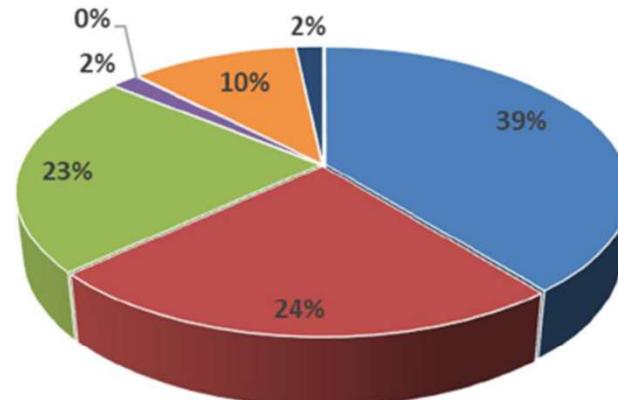
La gravité des procédures expérimentales est définie réglementairement (arrêté du 1^{er} février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets).

6 - Statut génétique des animaux



- Animaux sans altération génétique
- Altération génétique sans phénotype dommageable
- Altération génétique avec phénotype dommageable

7 – But des utilisations d'animaux

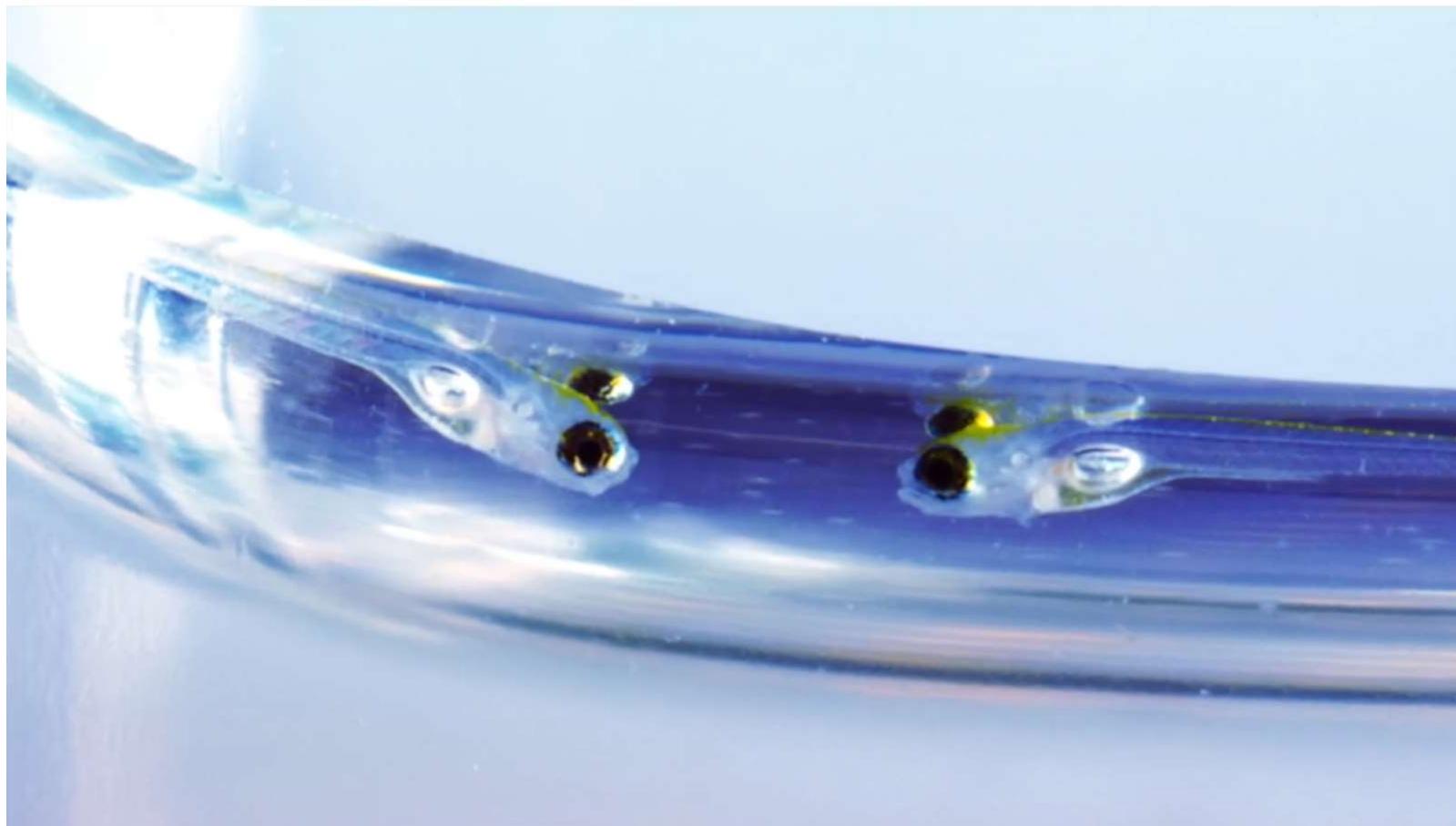


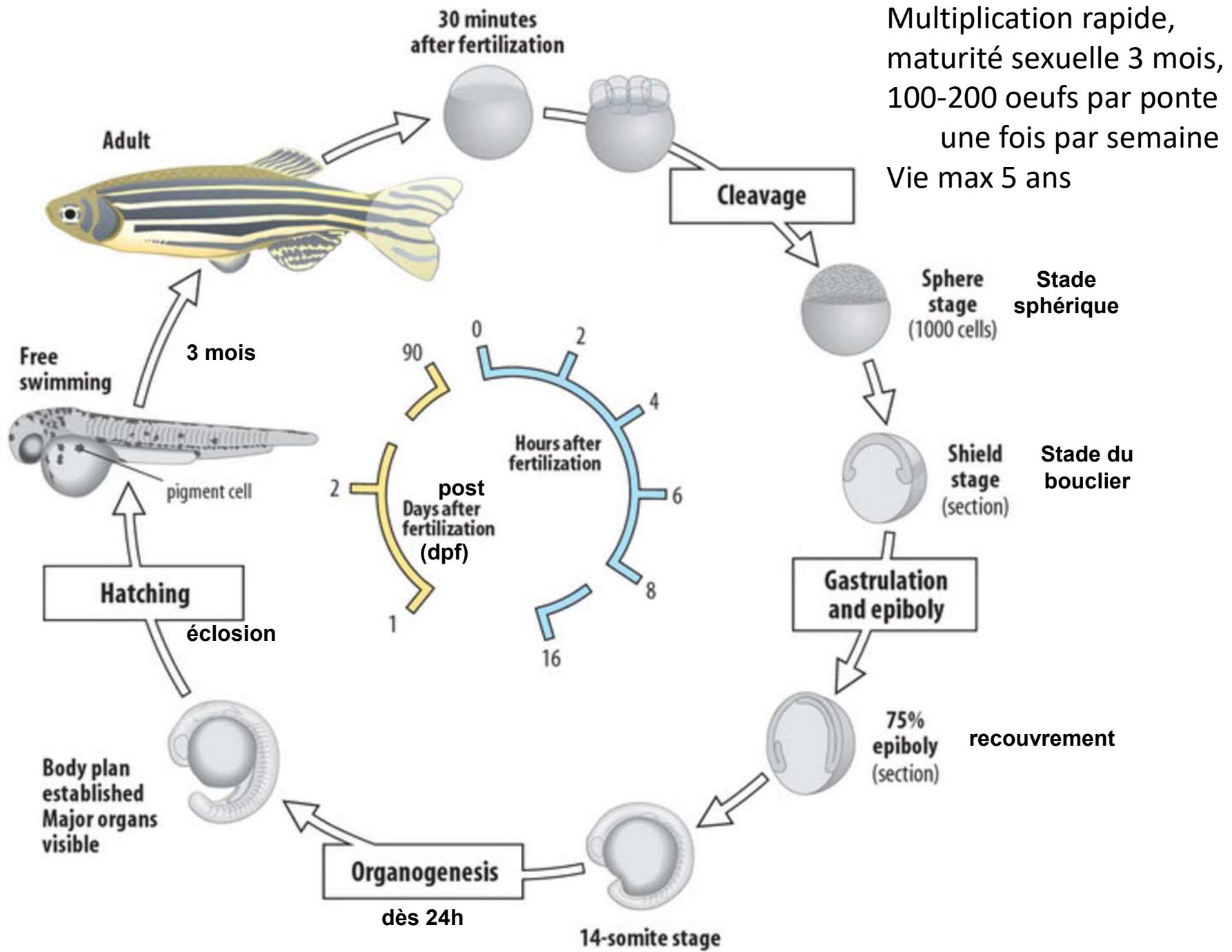
- Recherche fondamentale
- Recherche translationnelle
- Protection de l'environnement
- Formation
- Etudes toxicologiques et réglementaires
- Préservation des espèces
- Maintenance de colonies

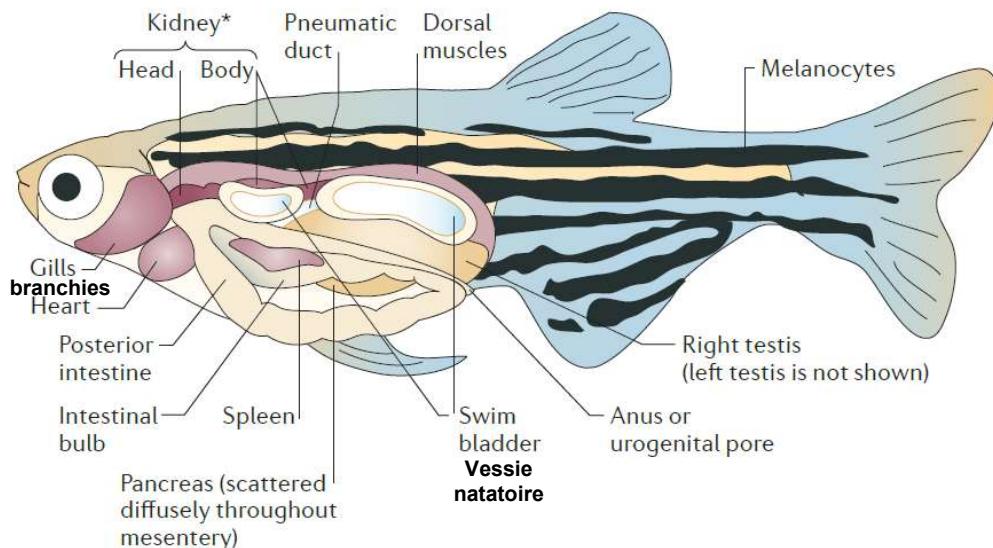
Zebrafish

Vidéo : zebrafish development

Intérêt du zebrafish : développement rapide







Anatomie :
 Certains organes identiques :
 Cerveau, cœur, rate, pancréas,
 intestins, reins, testicules, ovaires

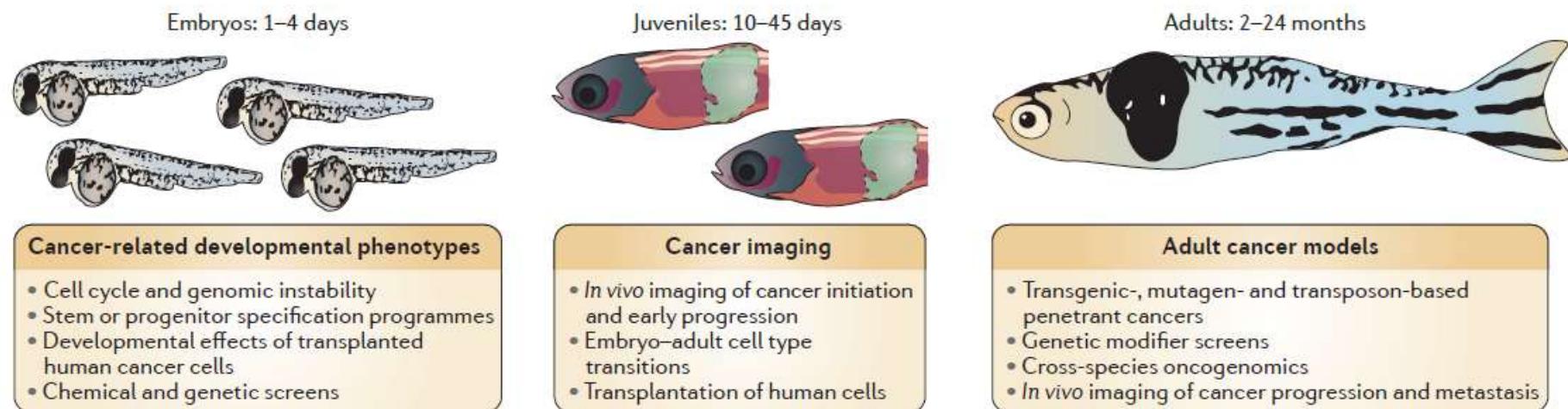


Figure 2 | **Studying cancer in the zebrafish.** Differently aged animals each offers distinct advantages for cancer-relevant

White *et al.*, 2013

Zebrafish

Vidéo : zebrafish mating and spawning
Reproduction accouplement et fraie

Conditions d'hébergement : adultes en aquarium et larves en boîtes de Pétri



Vidéo : cancer research focuses on zebrafish
Conditions d'hébergement : larves en boîtes de Pétri et adultes en aquarium



Manipulation : épuisette pour les adultes
eau filtrée ou pipette pour les embryons

Anesthésie : Tricaïne (methansulfonate) : TMS ou MS-222 dans l'eau
Sédation: 50 mg/l
anesthésie légère: 50-100 mg/l
anesthésie chirurgicale: 100-200 mg/l



Hébergement :

4 décembre 2025

JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

Texte 24 sur 130

11.6. Poissons zèbres

11.6.1. Qualité de l'eau

Tableau 11.1. – *Exigences relatives aux paramètres de l'eau dans les systèmes d'hébergement pour poissons zèbres*

Paramètres de l'eau	Minimum-maximum requis
Température	24 à 29 °C
Conductivité	150 à 1 700 µS/cm ²
Dureté totale	40 à 250 mg/L CaCO ₃
pH	6,5 à 8
Composés azotés	NH ₃ /NH ₄ ⁺ < 0,1 (*) mg/L, NO ₂ ⁻ < 0,3 mg/L, NO ₃ ⁻ < 25 mg/L
Oxygène dissous	> 5 mg/L

(*) ou inférieure à la limite de détection. 0,1 mg/L indique la quantité totale d'ammoniac, NH₃/NH₄⁺. Elle correspond à 0,002 mg/L de NH₃ à 28 °C avec un pH de 7,5.

11.6.2. Eclairage

Pendant la phase de jour, le niveau d'éclairage doit être constant, sauf lors des courtes transitions correspondant à l'aube/au crépuscule, le cas échéant. La phase de nuit doit être complètement obscure.

11.6.3. Densité de peuplement et complexité de l'environnement

Le volume d'eau utilisé pour les poissons zèbres adultes n'est pas inférieur à 1 litre. La densité de peuplement n'est pas supérieure à 10 poissons adultes/litre. La taille et la forme de l'aquarium permettent aux poissons de se comporter et de nager naturellement.

Les hébergements individuels prolongés sont évités.

Euthanasie :

ANNEXE IV

MÉTHODES DE MISE À MORT DES ANIMAUX UTILISÉS À DES FINS SCIENTIFIQUES

A. – Tableau des techniques appropriées en fonction des espèces animales :

Injection de cellules pour modèles de xénogreffes :

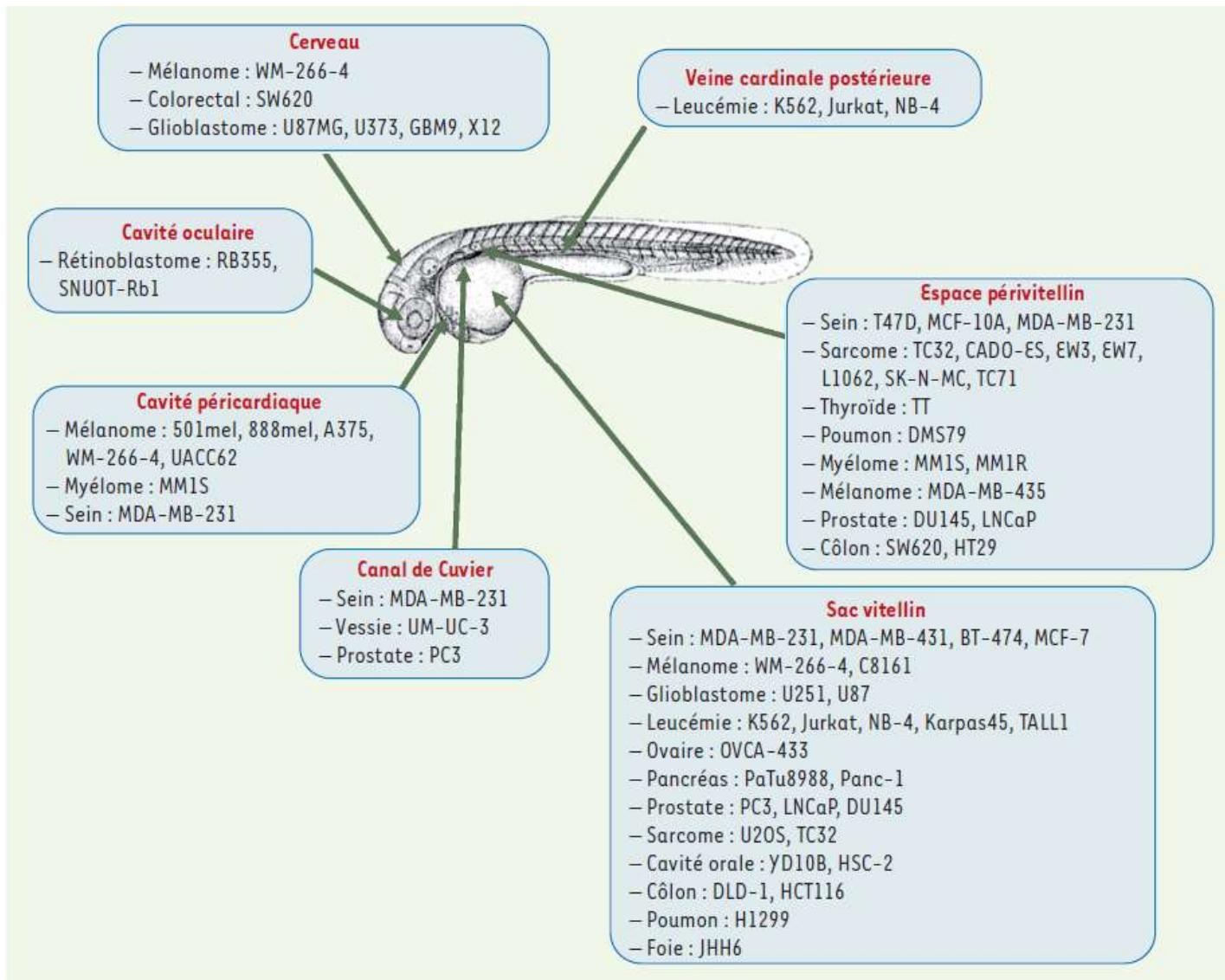


Figure 3. Illustration des sites d'injection les plus communs utilisés lors des expériences de xénotransplantation dans les embryons de poisson zèbre de 2 jours. De nombreuses lignées cellulaires humaines issues de différents organes ont été utilisées et injectées en divers sites de l'embryon. Völkel *et al.*, 2018

Bio Protoc. 2018 Sep 20; 8(18): e3027.

Published online 2018 Sep 20. doi: [10.21769/BioProtoc.3027](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3027)

PMCID: PMC8328589

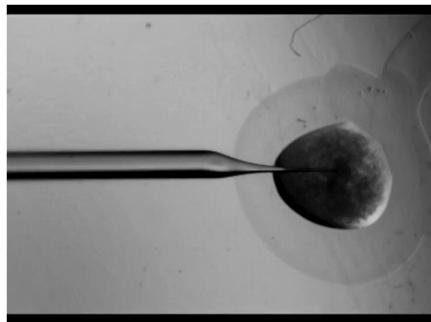
PMID: [34395813](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34395813/)

Zebrafish Embryo Xenograft and Metastasis Assay

Iikka Paatero,^{1,*} Sanni Alve,³ Silvia Gramolelli,³ Johanna Ivaska,^{1,2} and Päivi M. Ojala^{3,4,5,*}



L'extrémité de la pipette est cassé



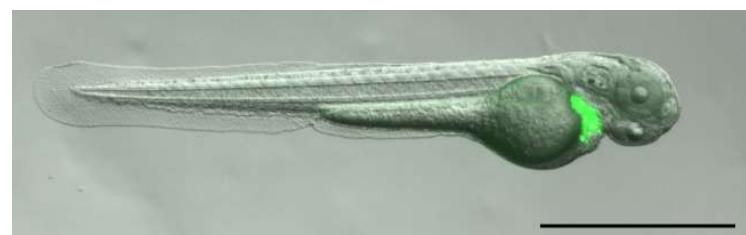
Aspiration du matériel dans une gouttelette



Injection dans l'espace péricardiaque



Les embryons sont fixés dans un gel



Embryon transplanté avec des cellules fluorescentes

Vidéo : generation of zebrafish larval xenografts

Microinjection sous microscope, et suivi du développement de la tumeur
(jusque 6'50)

Generation of zebrafish larval xenografts and tumor behavior analysis

Mayra Martinez-Lopez ^{1,2}, Vanda Póvoa ¹ and Rita Fior ^{*1}

1. Champalimaud Centre for the Unknown, Champalimaud Foundation, 1400-038 Lisbon, Portugal

2. Instituto Gulbenkian de Ciéncia, 2780-156 Oeiras, Portugal

* Corresponding Author

Generation of Zebrafish Larval Xenografts and Tumor Behavior Analysis

Xenografts in zebrafish embryos as a rapid functional assay for breast cancer stem-like cell identification

Arrate Eguiara, Olaia Holgado, Izaskun Beloqui, Leire Abalde, Yolanda Sanchez, Carles Callop & Angel G. Martin

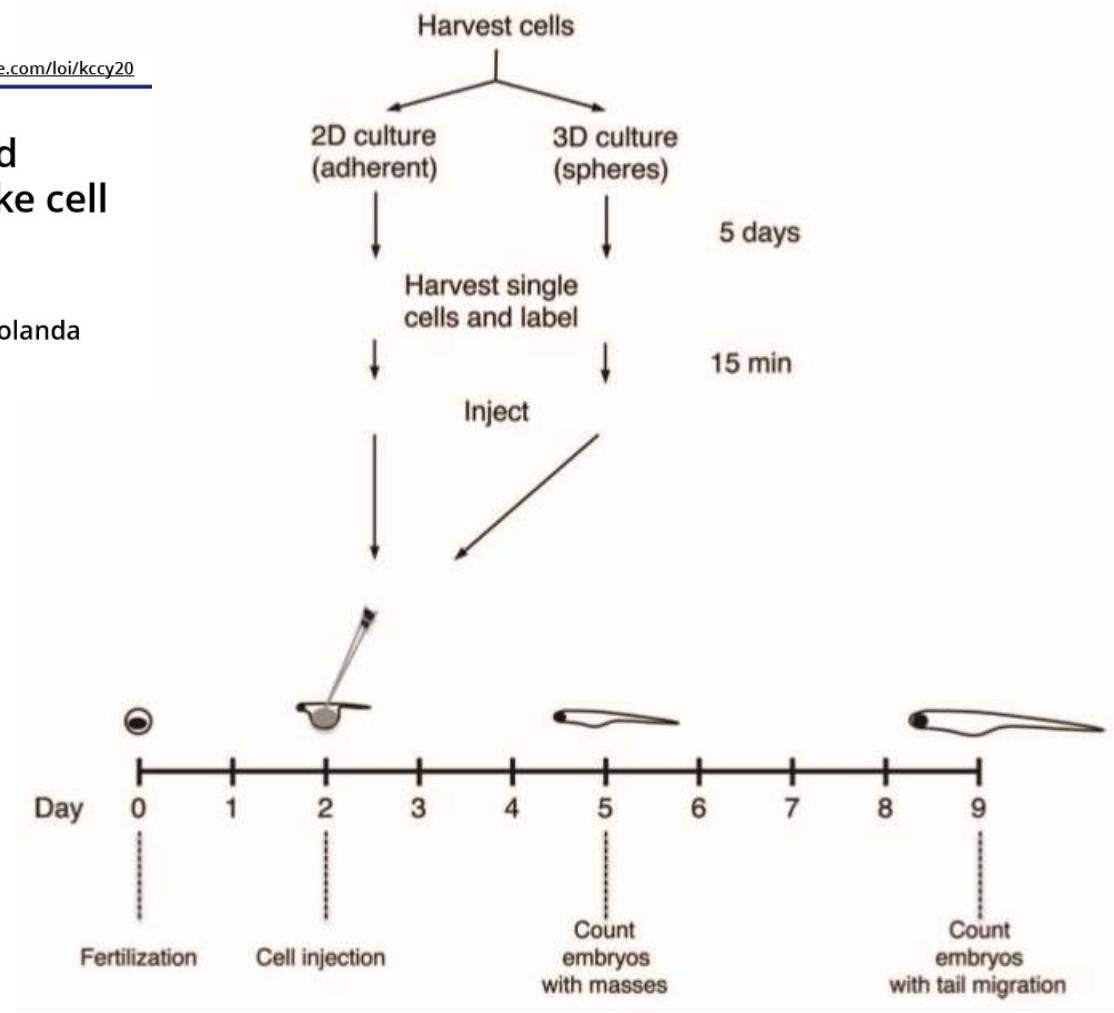


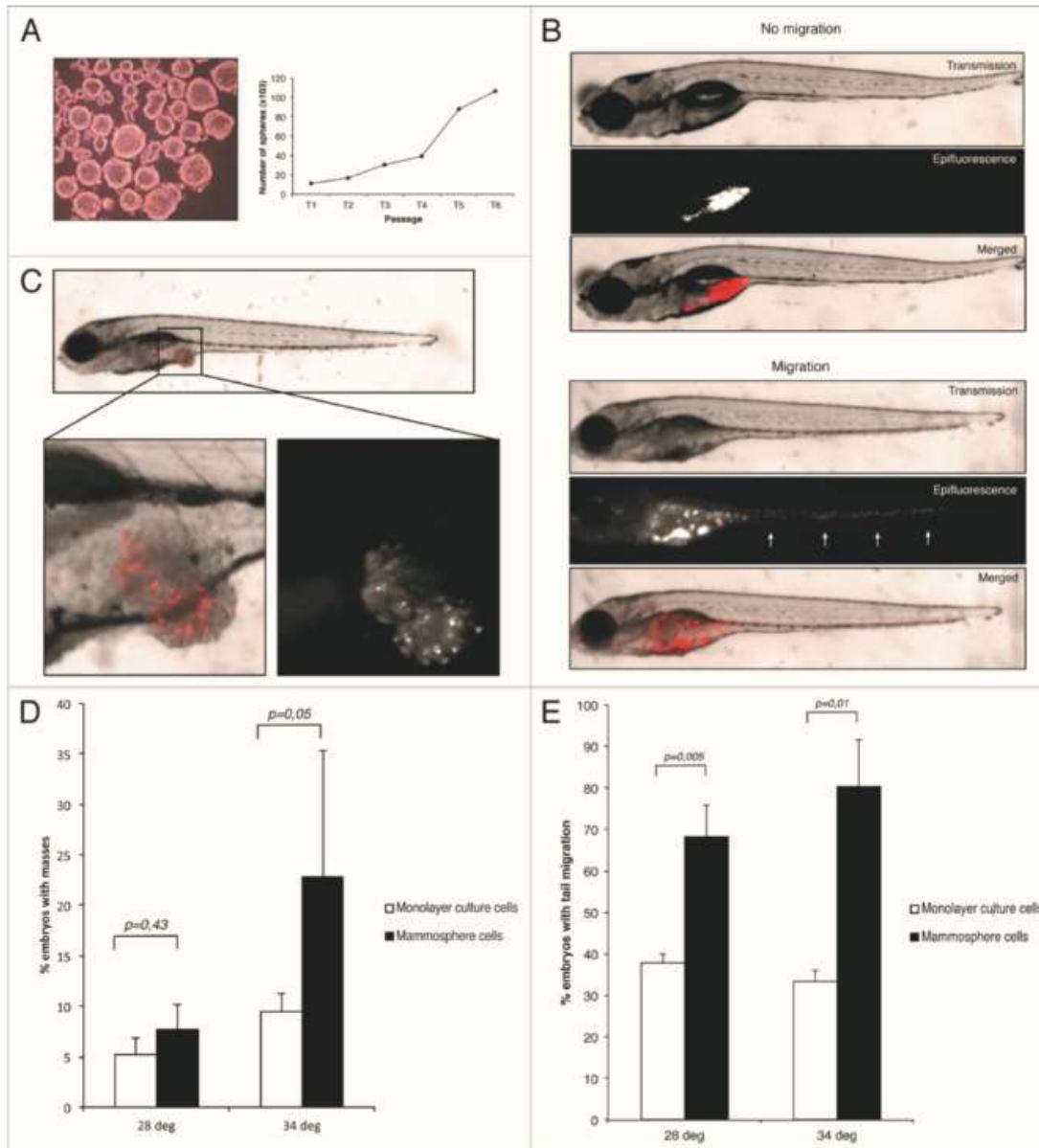
Figure 1. Schematic representation of experimental design. Breast carcinoma cells were grown as monolayer cultures or as non-adherent mammospheres for 5 days, on the same culture medium. After 5 days cells were harvested and sphere disaggregated using enzymatic and mechanical procedures, as described under Methods. Single cell suspensions were stained with the red-fluorescent tracking dye CM-Dil (4.8 μ g/ml) for 15 min, washed and loaded into a pulled glass micropipette. Two dpf zebrafish embryos, prepared as described under Methods, were injected with stained cells in the yolk sac and the presence of cells observed under the microscope. Embryos with no cells or cells located elsewhere than the yolk sac were excluded from the experiments. One hundred animals were used for each experiment. Three days after the injection the number of embryos with evident cell masses were counted. Seven days after the injection the number of embryos with red cells in the tail section were counted.

Sphere culture proliferation

cell mass in 5 dpf embryo

3 dpf embryos

% embryos with cell mass



9 dpf embryos without or with migration

7 dpf embryos

% embryos with tail migration

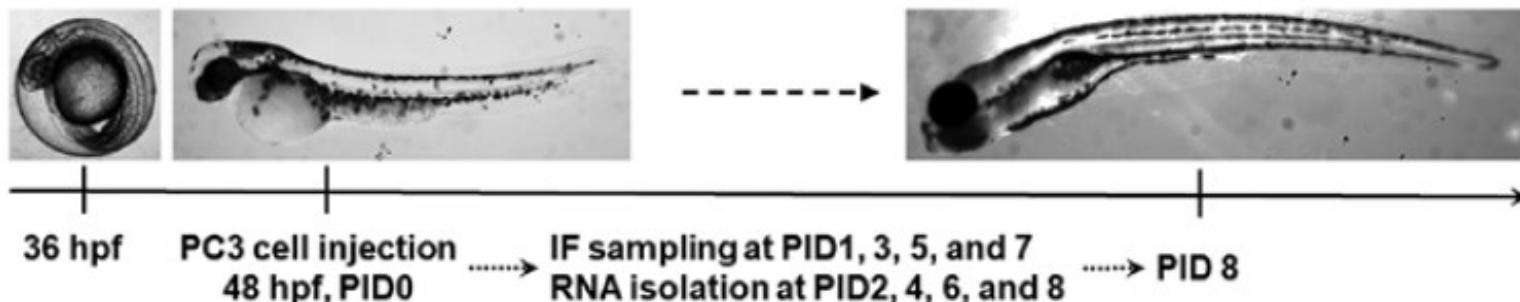
Figure 2. Mammosphere-derived cells migrate to the tail and form masses in zebrafish embryos. (A) Representative experiment of a 7-days mammosphere culture from BT-474 breast carcinoma cell line. Quantification of the proliferation of sphere cultures upon serial passage is represented. Sphere passages are named T to distinguish from regular monolayer culture passage (usually referred as P). (B) Representative image of an 9 dpf embryo with the injected cells retained in the yolk sac (upper part) or showing dissemination of the injected cells to the tail (lower part). (C) Representative image of a 5 dpf embryo showing a protruding cell mass in the yolk sac area. (D) Quantification of the number of embryos with evident mass formation 3 d post injection of the indicated cell populations, incubated at 28 or 34°C. The average of three experiments is shown. Statistical significance was assessed by Student t-test analysis and significance expressed as the value of p. (E) Quantification of the number of embryos with evident tail migration 7 d post injection of the indicated cell populations, incubated at 28 or 34°C. The average of three experiments is shown. Statistical significance was assessed by Student t-test analysis and significance expressed as the value of p.

Characterization of prostate cancer cell progression in zebrafish xenograft model

WEI XU^{1,2}, BRITTANY A. FOSTER^{1,3}, MACKENZIE RICHARDS^{1,2},
KENNETH R. BONDIOLI^{1,3}, GIRISH SHAH⁴ and CHRISTOPHER C. GREEN^{1,2}

¹Louisiana State University Agricultural Center; ²School of Renewable Natural Resources, Louisiana State University; ³School of Animal and Food Sciences, Louisiana State University, Baton Rouge, LA 70808; ⁴School of Pharmacy, University of Louisiana, Monroe, LA 71201, USA

Received August 11, 2017; Accepted October 13, 2017

a

Microinjection of prostate cancer cell line to zebrafish embryos. A prostate cancer cell line, PC3-CTR was used for microinjection. The cells were cultured overnight at 37°C with 5% CO₂ supply in the RPMI-1640 medium (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA) supplemented with 10 mM HEPES, 25 mM NaHCO₃, 10% fetal bovine serum (FBS; VWR/Life Science, Radnor, PA, USA), 200 mg/l geneticin (VWR/Life Science), 100 µg/ml penicillin G, and 100 µg/ml streptomycin (100x Amresco penicillin/streptomycin stocking solution from VWR/Life Science). Thereafter, the cells were incubated with a live-cell imaging dye Qtracker® 525 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 1 h at 37°C to be fluorescently labeled. The labeled PC3-CTR cells were digested by 0.05% Trypsin (Corning Life Sciences) and re-suspended in phosphate-buffered saline (PBS; Corning Life Sciences). The cell density in the suspension was calculated based on cell counting with a hemocytometer and was adjusted to 500 cells/ml in PBS.

The zebrafish embryos at 48 h post fertilization (hpf) were manually dechorionated, and anesthetized with 10 µg/ml tricaine methanesulfonate (MS-222; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and transferred to 50 µl drops of filtered aquarium water with 10 µg/ml MS-222 under oil in a 5-cm diameter petri-dish, also containing a 20 µl drop of PC3-CTR cells diluted in PBS suspension. Microinjection was performed with an Eppendorf CellTram microinjection system, on a Nikon Eclipse TE200 inverted microscope. Cells were back-filled into the microinjector (22 µm ID) and five to six PC3-CTR cells were injected subcutaneously through the sinus venosus above the yolk (Fig. 1B). The embryos were immediately transferred to fresh filtered aquarium water and incubated at 37°C for 2 h. Following, the embryos were maintained at 32 or 28°C for up to 12 days post transplantation (14 days post fertilization).

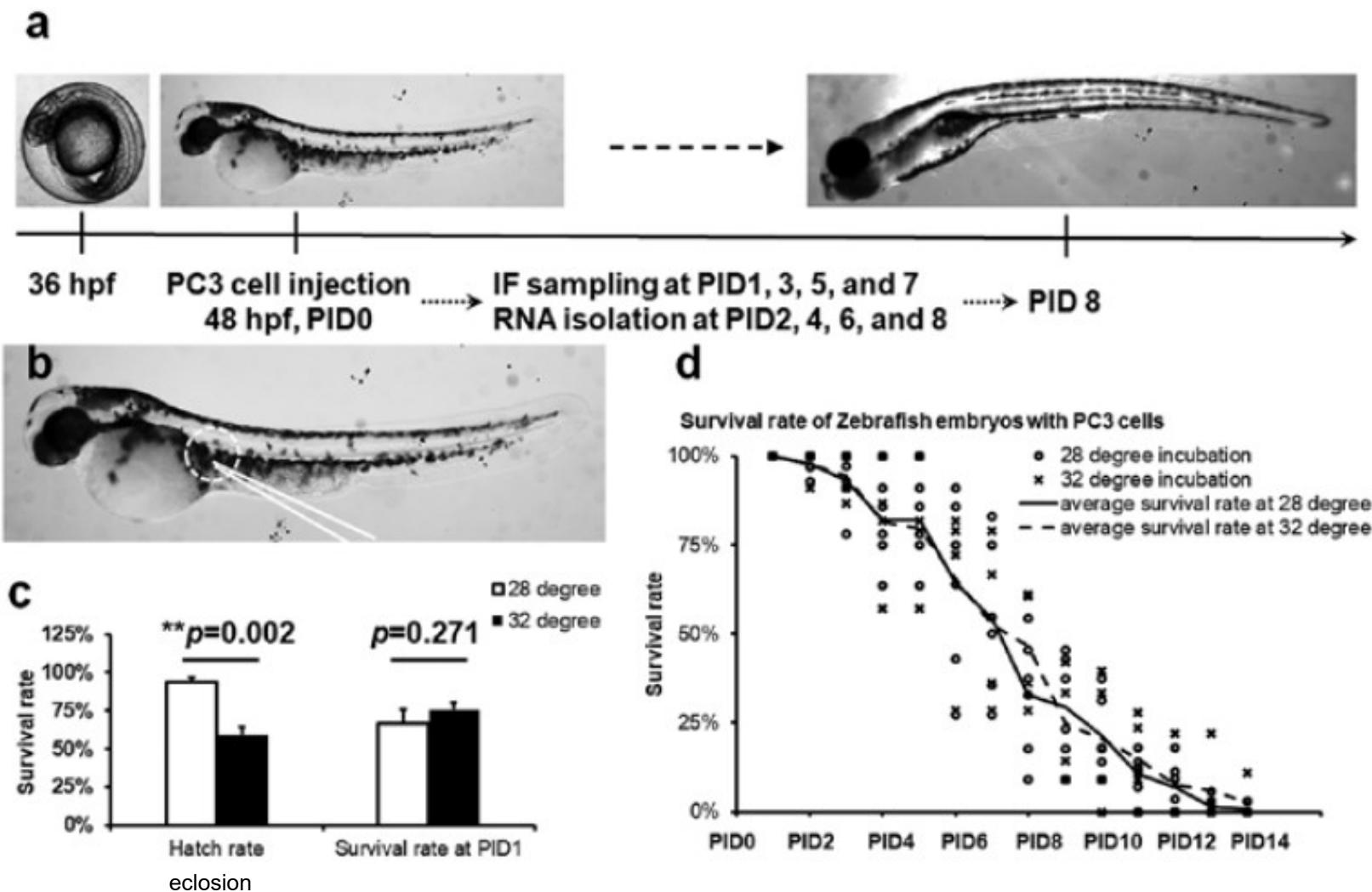
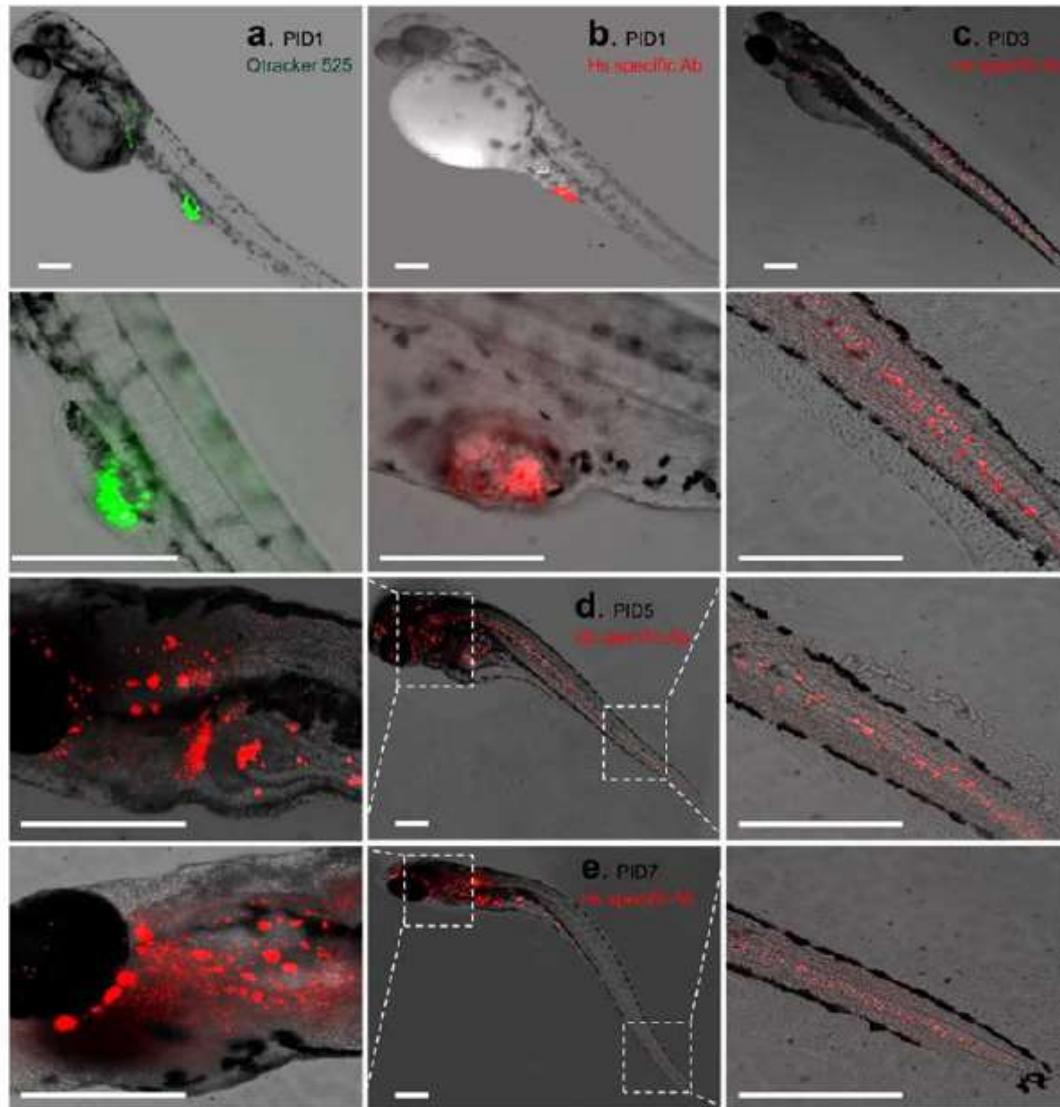


Figure 1. Experimental design and conditions for zebrafish xenograft model. (a) The PC3-CRT cells were introduced subcutaneously to zebrafish embryos at 48 h post fertilization (hpf) followed by an incubation at 28 (n=350) or 32°C (n=277). (b) The microinjection site in zebrafish embryo is indicated with white circle. (c) The hatching rates of zebrafish embryos and survival rates of zebrafish larvae at PID1 incubated at 28 (n=318) or 32°C (n=169). (d) Survival rates of zebrafish larvae implanted with PC3 cells during post injecting nursing at 28 (n=318) or 32°C (n=169). PID, post injection day; IF, immunofluorescence.

Green : live cell tracking dye Qtracker 525



red : IF staining by human nucleus antibody

Figure 3. Migration and proliferation of PC3-CRT cells *in vivo*. (a) The PC3-CRT cells at PID1 were tracked by the live cell tracking dye Qtracker 525 (green). (b) The PC3-CRT cells *in vivo* were monitored by immunofluorescent staining by human nucleus specific antibody with Alexa 594 labeled secondary antibody (red). (c) PC3-CRT cell migration and proliferation *in vivo* at PID3. (d) Signals for PC3-CRT cells *in vivo* at PID5. Higher magnifications were used to visualize the detailed distributions of PC3-CRT cells at anterior (left) and posterior (right) sections. (e) Distribution of PC3 cells at PID7 *in vivo*, with higher magnification at anterior (left) and posterior (right) sections. Scale bar, 200 μ m.

Rats / Souris

Cycle vital



naissance



10 jours, non sevrés



6-8 semaines, jeunes adultes

Rats

Manipulation : utiliser des gants
attraper par la queue (ne se retourne pas)



Si le rat est calme, vous pouvez le saisir doucement par le corps. Il existe plusieurs techniques différentes pour la contention des rats, en voici quelques exemples sur photos.



Vidéo : scruff handling of rats



SCRUFF HANDLING OF RATS (incl. front leg restrained)

Department of Veterinary Disease Biology
University of Copenhagen

Sexage : Chez le rat mâle immature, la distance ano-génitale est beaucoup plus importante que chez la femelle. Chez le mâle adulte, la présence des testicules est évidente.



Hébergement :

7 février 2013

JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

Texte 30 sur 130

Tableau 1.2. – *Rats*

	POIDS CORPOREL (g)	DIMENSION MINIMALE du compartiment (cm ²)	SURFACE AU SOL par animal (cm ²)	HAUTEUR MINIMALE du compartiment (cm)	DATE d'application
Réserve et pendant les procédures (*)	Jusqu'à 200	800	200	18	1 ^{er} janvier 2017
	De plus de 200 à 300	800	250	18	
	De plus de 300 à 400	800	350	18	
	De plus de 400 à 600	800	450	18	
	Plus de 600	1 500	600	18	

Tableau 1.1. – *Souris*

	POIDS CORPOREL (g)	DIMENSION MINIMALE du compartiment (cm ²)	SURFACE AU SOL par animal (cm ²)	HAUTEUR MINIMALE du compartiment (cm)	DATE d'application
Réserve et pendant les procédures	Jusqu'à 20	330	60	12	1 ^{er} janvier 2017
	De plus de 20 à 25	330	70	12	
	De plus de 25 à 30	330	80	12	
	Plus de 30	330	100	12	



Identification :

- marqueur sur la queue des rats blancs
- tatouage
- poinçons sur les oreilles :



Contentionner le rat et identifier par des perforations à l'aide du poinçon sur le pavillon de l'oreille.



Administration par injection :

Intradermique :

- Aiguille : 26-27 G;
- Volume maximum : 0,015 ml.

Vous devez être deux pour exécuter la technique. Contentionner le rat au niveau du cou et des pattes supérieures en laissant la peau du dos libre et en maintenant la queue. La deuxième personne doit raser le site, le désinfecter et tendre la peau pour faire l'injection. Piquer à 2 mm de profond avec un angle de 30°.

*En surface :
entre l'épiderme
et le derme*



Sous-cutanée :

- Aiguille : entre 25 G et 27 G $\frac{1}{2}$ po;
- Volume maximum ; 10 ml/kg.

Maintenir le rat sur une table en soulevant la peau du dos, injecter sous les doigts entre l'index et le pouce à l'intérieur du repli de peau.



*Tissu conjonctif
au niveau du dos*

Intra péritonéale :

- Aiguille : 23 G ¾ po;
- Volume maximum : 10 ml/kg.

La technique s'exécute seule ou à deux. Maintenir le rat contre une cage pour exposer l'abdomen. Insérer au complet l'aiguille avec un angle de 45° dans les cadans inférieurs droits et gauches de l'abdomen. Éviter les cadans supérieurs et la ligne médiane au bas de l'abdomen où se situe la vessie.



Intramusculaire :

- Aiguille : 25 G ½ po;
- Volume maximum : 0,2 ml.

Vous pouvez réaliser la technique à deux ou seul. Étirer la patte et mettre le muscle en évidence en le pinçant. Introduire l'aiguille de côté en direction médiale dans la région la plus épaisse du muscle.



Intraveineuse :

- Aiguille : 25 G ½ po;
- Volume maximum : 5 ml/250 g.

Utiliser une cage de contention. Deux veines sont visibles de chaque côté de la queue et permettent de faire l'injection.



Vidéo : mouse IV
tail vein injection

N.B. le vaisseau central est une artère.

*N.B. dilater la veine : dans eau chaude (52 °C)
sous lampe chauffante
xylène*



Mouse Intravenous (IV) Tail Vein Injection

Prélèvements sanguins :

Attention aux prélèvements trop importants
trop fréquents

Pour éviter choc hypovolémique à court terme :
ou anémie à long terme

10 % du volume sanguin circulant toutes les 4 semaines
(remplacer par sérum physiologique)

1% toutes les semaines

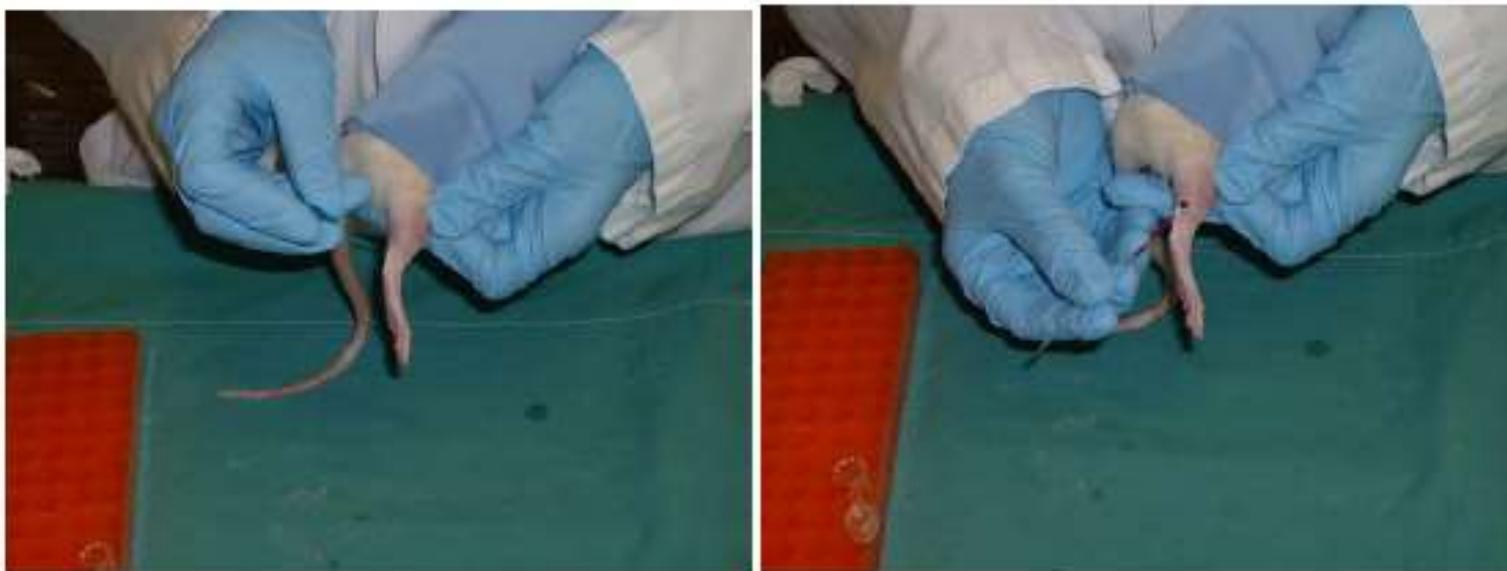
N.B. 30 ml de sang circulant pour un rat de 300-400 g

Veine saphène

➤ Aiguille : 23 G à 18 G

Ce site est privilégié pour les prélèvements répétitifs de petites quantités et ne nécessite pas d'anesthésie.

Appliquer un onguent (gelée de pétrole) pour empêcher la goutte de diffuser sur la peau.

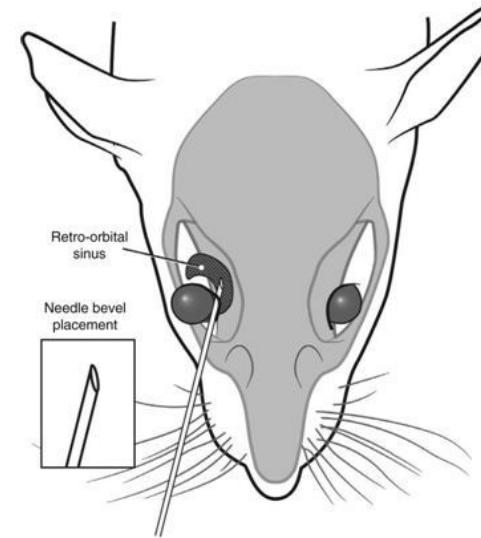
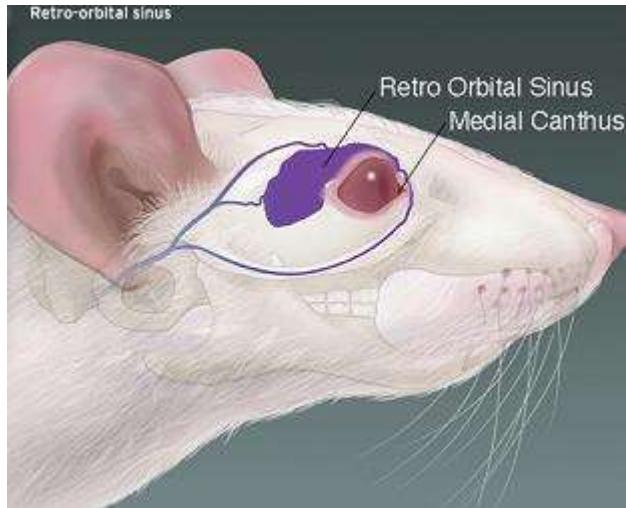


Piquer la veine et récolter la goutte à l'aide d'un capillaire ou d'un tube.

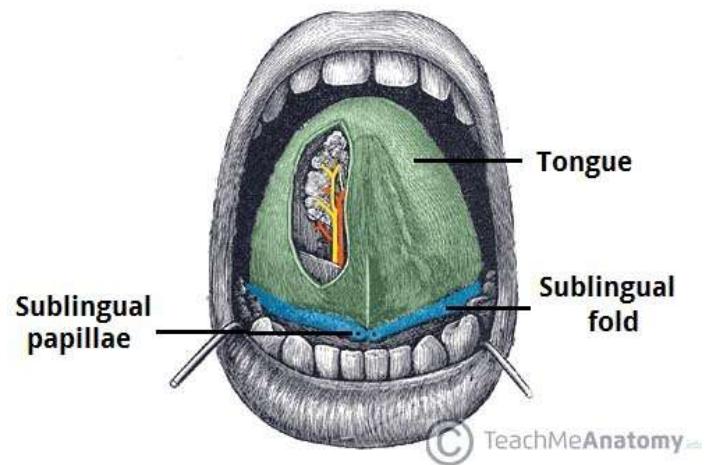
Arrêter le saignement en appuyant à l'aide d'une gaze.

Rétro-orbital

Prélèvements de petites quantités avec capillaire
Nécessite anesthésie : locale ou gazeuse



Sublingual



Gingival



Veine jugulaire

- Aiguille : 23 G 1 po;
- Volume maximum : 2,5 ml à 5 ml.

Cette technique s'effectue seul et sans anesthésie. Contensionner l'animal en ramenant les pattes dans le dos afin de mettre en évidence les deux épaules. À l'aide de l'index, basculer la tête vers l'arrière pour mettre la jugulaire en extension. Insérer l'aiguille graduellement en retirant le piston. Lorsque le prélèvement est terminé, pincer le site de prélèvement à l'aide d'une gaze pour arrêter le saignement.



Ponction cardiaque :

- Aiguille : 22 G 1 po;
- Seringue : 15 ml.

Ce prélèvement peut être effectué seulement sur un animal que l'on euthanasie. Il permet de prélever la dose maximum de sang.

Piquer avec un angle de 30° au côté gauche du sternum de l'animal.



Tirer doucement le piston et retirer tout le sang (environ 10-12 ml) et euthanasier l'animal.



Anesthésie :

- pour réveil : kétamine / xylasine (intramusculaire ou intrapéritonéal)
isoflurane (gaz)



Euthanasie :

ANNEXE IV

MÉTHODES DE MISE À MORT DES ANIMAUX UTILISÉS À DES FINS SCIENTIFIQUES

A. – Tableau des techniques appropriées en fonction des espèces animales :

Souris

Manipulation : utiliser des gants
attraper par la base de la queue (se retourne)
par le dos / cou

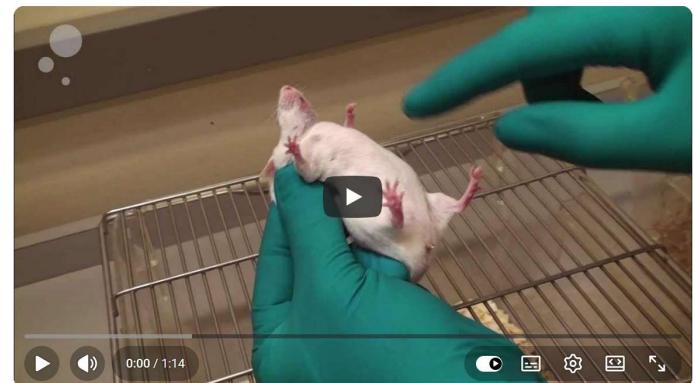
Il est très important de saisir la souris par la base de la queue et non l'extrémité de celle-ci.
Maintenir une traction sur la queue afin que la souris s'agrippe et s'immobilise.



Avec l'autre main, avancer l'index et le pouce de chaque côté de la souris en appuyant vers la surface de travail et bien saisir la peau du cou et du dos.



Vidéo : tail and scruff
Handling of mice



Prélèvements sanguins :

Mandibulaire :

- Aiguille : 18 G ou lancette;
- Volume maximum : 20 g (poids corporel) = 0,28 ml;
30 g (poids corporel) = 0,42 ml.

Cette technique est utilisée pour récolter une quantité plus importante de sang.
L'anesthésie n'est pas nécessaire.

Bien contentionner la souris et percer la veine à l'aide de la pointe de l'aiguille ou de la lancette (http://www.medipoint.com/html/body_animal_lancets.html) à l'endroit indiqué sur le schéma.
Laisser dégoutter au-dessus d'un contenant épendorf (ou autre) le nombre de gouttes requises.

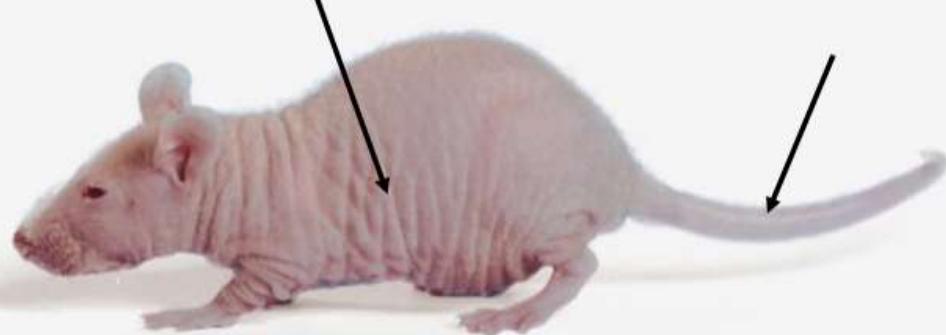


Essuyer à l'aide d'une gaze en maintenant une légère pression. Ne pas raser ou mouiller les poils avant le prélèvement.

Injection des cellules cancéreuses en xénogreffe

Sous-cutanée
(dans les flancs de l'animal)

étude des mécanismes
de prolifération



Intra-veineuse

étude des mécanismes
de migration/invasion

Orthotopique
(dans l'organe d'intérêt)

étude des mécanismes
de prolifération puis
de migration/invasion

Vidéos : subcutaneous xenograft (3 tumors implantation)
subcutaneous xenograft test



Vidéos : how to implant tumors ?

how we inject mice for breast cancer studies

(orthotopic injection into mammary gland, à partir de 1'30)
an orthotopic murine model of human prostate cancer metastasis



How to implant tumors?

2 k vues • il y a 10 mois



Ani M

How to implant tumors? Orthotopic tumor implantation into 4th mammary gland in mice Materials: • Cultured tumor cells • 50 mL ...



How we inject mice for breast cancer studies!

Il y a 3 ans

[youtube.com](https://www.youtube.com)



An Orthotopic Murine Model of Human Prostate Cancer Metastasi...

Il y a 5 ans

jove.com

