



UNIVERSITÉ
LAVAL

Direction des services vétérinaires

Procédure normalisée de fonctionnement

Objet : Reproduction des poissons-zèbres	Numéro : RE-2
Portée : Ceci est une directive de la Direction des services vétérinaires (DSV) à l'intention des utilisateurs et du personnel des animaleries de l'Université Laval (campus et centres de recherche affiliés).	
Préparée par Marie-Christine T. Dion <i>Professionnelle de recherche, Laboratoire de recherche en sciences aquatiques</i>	Date : 19 décembre 2017
Révisée par Anne-Marie Catudal <i>Vétérinaire clinicienne, Direction des services vétérinaires</i>	Date : 11 janvier 2018
But : Décrire les procédures de reproduction des poissons-zèbres.	Version 1

Généralités

- L'acquisition d'animaux destinés à l'établissement d'une colonie interne doit respecter la PNF IE-3 Acquisition de poissons-zèbres.
- La mise en place et la gestion d'une colonie de poissons-zèbres (*Danio rerio*) nécessitent au préalable l'approbation du comité de protection des animaux (CPA).
- Il est primordial de s'assurer que le nombre d'animaux produits est maintenu au minimum. Il doit couvrir les besoins pour le maintien de la colonie et le transfert d'animaux sur le protocole expérimental.
- Le CPA encourage fortement l'utilisation de la cryopréservation afin de réduire le nombre d'animaux produits et de préserver la lignée en cas d'imprévus.
- Le chercheur responsable, en collaboration avec le personnel technique de l'animalerie, doit tenir à jour la documentation adéquate pour s'assurer que le nombre d'animaux utilisés pour la reproduction, le nombre de naissances, le nombre d'animaux transférés sur protocole expérimental et le nombre d'animaux non utilisés correspond à ce qui a été approuvé par le CPA.
- Le chercheur responsable, en collaboration avec le personnel technique de l'animalerie, doit effectuer un suivi serré du succès des couples reproducteurs et le documenter afin d'assurer une saine gestion de la colonie.
- Le chercheur responsable, en collaboration avec le personnel technique de l'animalerie, doit déterminer le phénotype des animaux provenant de sa colonie, en fonction de la modification génétique de l'animal, du sexe et de l'âge. Une bonne connaissance du phénotype permet d'adopter des points limites qui permettront de réduire l'inconfort et la détresse pouvant être associés à certains traits phénotypiques.

- Tous les phénotypes pouvant nuire à la santé de l'animal ainsi que les soins nécessaires doivent être identifiés dans les protocoles et connus du personnel de l'animalerie.
- La stratégie de reproduction sera choisie en fonction des besoins, mais devra tenir compte en tout temps du bien-être des animaux reproducteurs et des normes d'hébergement (densité adéquate de juvéniles).
- Seuls les animaux en santé doivent être utilisés pour la reproduction.
- La photopériode est un élément clé pour la reproduction de ces poissons. La reproduction a généralement lieu quelques heures après le lever du jour.
- Les poissons-zèbres préfèrent pondre en eau peu profonde, un bassin de reproduction offrant un gradient de profond à peu profond est souvent idéal pour un meilleur succès de reproduction.

Procédures

Choix des reproducteurs

- Le chercheur responsable, ou autre personne déléguée, détermine quels seront les animaux à reproduire.
- Les animaux mis en accouplement doivent avoir au minimum 2-3 mois d'âge. La reproduction des femelles est à son meilleur entre 6-18 mois et celle des mâles entre 6-12 mois. La quantité et la qualité des œufs sont ensuite un peu moins élevées.
- Les reproducteurs sont normalement remplacés lorsqu'il y a diminution significative du nombre d'œufs par ponte ou lorsque les œufs sont de mauvaise qualité après 2-3 pontes.

Reproduction in vivo

Généralités

- Les accouplements peuvent être faits de façon monogame (1 mâle avec 1 femelle), en trio (1 mâle avec 2 femelles) ou en groupe (pour maintien d'une lignée avec plus grande diversité génétique, par exemple).
- Les informations sur les pontes doivent être inscrites sur les pétris et dans le registre de suivi de la colonie.
- Il faut attendre au moins 1 heure après le dernier repas des poissons avant de les placer dans les bassins de reproduction, afin de maintenir une qualité d'eau adéquate durant la nuit. Ne pas nourrir les poissons dans les bassins statiques.
- Les bassins avec les individus reproducteurs doivent être placés dans un endroit présentant les mêmes conditions que l'unité d'élevage (température et luminosité). Si la salle est à la même température que l'eau d'élevage, il est possible de laisser

les bassins de reproduction dans cette salle. Sinon, les placer dans un incubateur avec le même cycle de luminosité.

- Les femelles utilisées doivent avoir un repos d'une semaine après une reproduction.

Procédure

- En fin d'après-midi, préparer le nombre de bassins de reproduction requis. Utiliser l'eau du système pour les remplir.
 - Si le moment de la ponte est important (ex. : pour micro-injection), placer un séparateur dans chacun des bassins afin de mettre les mâles d'un côté et les femelles de l'autre.
 - Si le seul objectif est d'obtenir des œufs pour renouveler les reproducteurs de la colonie, placer les mâles et les femelles dans le même bassin de reproduction, sans séparateur.
- Puiser les poissons doucement afin d'éviter de les stresser et de les blesser. Faire attention de ne pas les écraser entre la paroi du bassin et le filet lors de la capture.
- Une fois les poissons transférés, s'assurer que les couvercles sont bien fermés afin de prévenir les évasions (poissons portés à sauter).
- Bien identifier les bassins de reproduction en fonction des lignées utilisées, de la provenance des individus et toutes autres informations pertinentes. Consigner le tout dans le registre de suivi de la colonie.
- Si la technique de reproduction avec séparateur a été utilisée, retirer le séparateur du bassin le matin juste avant l'ouverture des lumières, afin de permettre aux poissons de se reproduire. Cela a généralement lieu dans l'heure qui suit l'ouverture des lumières.
- Une fois la reproduction terminée, retirer les adultes des bassins de reproduction et les replacer dans le système d'élevage.
- Récolter les œufs en versant tranquillement l'eau du bassin à travers un petit tamis (format passoire à thé). Au besoin, rincer le fond du bassin avec de l'eau préparée pour les œufs (voir annexe 1 pour la recette) pour s'assurer de récolter tous les œufs. Rincer les œufs avec le même type d'eau pour retirer les débris.
- Verser le contenu du tamis dans un pétri en utilisant de l'eau préparée pour les œufs pour le rincer et récolter tous les œufs. Attention de ne pas mettre trop d'eau pour ne pas faire déborder le pétri.
- Au binoculaire, effectuer la sélection des bons œufs et les placer dans un nouveau pétri contenant de l'eau neuve préparée pour les œufs. Placer environ 50 œufs par pétri. Une fois terminée, placer les pétris dans un incubateur à 28,5 °C.
- Désinfecter les œufs qui seront placés en élevage dans la colonie entre 8 à 24 heures post-fertilisation (voir annexe 2).

- Effectuer le retrait des embryons non viables ou morts tous les jours pour les 4 premiers jours. Changer l'eau si elle devient trouble ou odorante. Au 5e jour, les larves sont aptes à nager et à s'alimenter.

Reproduction in vitro

Généralités

- La reproduction in vitro peut être effectuée pour différentes raisons, notamment lorsqu'une grande quantité d'œufs synchrones est requise, pour reproduire des poissons qui ne collaborent pas ou encore, pour faire la reproduction avec des poissons isolés (ex. : croisement entre l'élevage et la quarantaine).
- Cette manipulation est délicate, surtout pour les femelles, car il est facile de les blesser. Les pressions exercées doivent toujours être minimales. Des mortalités peuvent survenir à la suite de ces manipulations.
- Les mâles utilisés doivent avoir une période de repos d'au moins 3 semaines avant d'être réutilisés pour la reproduction in vitro. Après un repos d'une semaine, la reproduction in vivo peut être effectuée sans problème.
- Les femelles utilisées doivent avoir une période de repos d'au moins 1 mois avant d'être réutilisées pour la reproduction in vitro. Après un repos d'une semaine, la reproduction in vivo peut être effectuée sans problème.

Procédures

- En fin d'après-midi la veille des manipulations, appliquer les 4 premières étapes du protocole de mise en reproduction in vivo selon les besoins pour la reproduction in vitro.
- Le jour des manipulations, tôt le matin, préparer la zone de travail avec tout le matériel requis pour l'ensemble des manipulations (voir annexe 3). Allumer la source de lumière du microscope.
- Mettre 10-15 µl de solution saline Hank (voir annexe 4) dans des tubes de PCR et mettre sur glace. Si besoin, numéroter les tubes.
- Séparer les mâles et les femelles dans des bassins différents. Préparer 2 bassins de surplus avec de l'eau du système pour le réveil et le suivi des poissons post-manipulations.
- Extraire le sperme et les œufs et fertiliser les œufs.

Extraction du sperme

- Anesthésier un mâle dans l'Aqualife TMS (MS-222) selon la PNF A-13 Anesthésie et analgésie des poissons. L'anesthésie doit être assez profonde pour éviter de blesser le poisson lors de la manipulation.

- Essuyer délicatement le poisson sur un papier absorbant, principalement dans la région du pore uro-génital et le placer sur le dos dans la fente de l'éponge qui a été préalablement humidifiée.
- Essuyer de nouveau la zone du pore uro-génital avec un Kimwipes™ en boule, car un contact avec l'eau active les spermatozoïdes et compromet leur capacité à fertiliser les œufs.
- Sous le microscope, à l'aide des pinces millipore, écarter les nageoires pelviennes pour les placer de chaque côté du poisson.
- D'une main, approcher le tube capillaire du pore avec un angle d'environ 45 °. De l'autre, appuyer doucement sur l'abdomen avec les pinces orientées vers la queue.
- Lorsque le pore est bien visible, approcher le capillaire pour récolter le sperme. Retirer d'abord le capillaire du pore uro-génital et relâcher ensuite la pression sur l'abdomen du poisson.
- Placer le poisson dans le bassin de réveil et surveiller sa condition.
- Vider le capillaire dans un tube contenant de la solution saline Hank. Avec le capillaire, bien mélanger le sperme et la solution. Ce mélange peut être conservé jusqu'à 1 h 30 sur glace pour fertiliser des œufs.
- Répéter ces étapes pour tous les mâles sélectionnés.

Extraction des œufs

- Anesthésier une femelle dans le TMS selon la PNF A-13 Anesthésie et analgésie des poissons.
- Essuyer délicatement la femelle sur un papier absorbant. Elle doit être légèrement humide, mais pas mouillée. Si les œufs entrent en contact avec l'eau, le durcissement a lieu et il est impossible de les fertiliser.
- Placer la femelle dans un pétri sous le microscope.
- Humidifier ses doigts avant de manipuler la femelle, sinon elle collera sur les doigts.
- Supporter le dos de la femelle avec l'index. Avec le pouce, appuyer très légèrement sur l'abdomen de la femelle en direction du pore uro-génital. Il est possible de déplacer graduellement la femelle dans le pétri au fur et à mesure que les œufs sont expulsés.
- Placer la femelle dans le bassin de réveil et monitorer son état. Si des rougeurs apparaissent sur son ventre, cela signifie que la pression exercée était trop grande.
- Vérifier la qualité des œufs au microscope. Ceux-ci ne devraient pas être recouverts de gras. Des œufs de qualité devraient être jaune ou orange, translucides et de taille uniforme. La présence de bulles de gras, d'opacité ou de taille difforme peut résulter en un faible taux de fertilisation.

Fertilisation des œufs

- Prendre un échantillon de sperme avec un capillaire et le déposer sur les œufs d'une femelle. Agiter doucement le pétri pour s'assurer que tous les œufs sont en contact avec le sperme. Attendre 30 secondes.
- Ajouter 1 ml d'eau du système dans le pétri afin d'activer les spermatozoïdes et de réaliser la fertilisation. Lorsque les œufs et le sperme sont de qualité, il est possible d'atteindre un taux de fertilisation de 60-90 %.
- Après 2 minutes, ajouter de l'eau préparée pour les œufs pour remplir le pétri. Bien identifier le tout et placer en incubation à 28,5 °C avec une photopériode similaire au système d'élevage.
- Répéter les étapes d'extraction des œufs et de fertilisation pour toutes les femelles sélectionnées.
- Les œufs placés en incubation doivent être nettoyés en après-midi (retirer les œufs non fertilisés, les débris, etc.) et l'eau doit être renouvelée. Pour ce faire, prendre un nouveau pétri, ajouter un peu d'eau et pipetter les bons œufs du pétri incubé dans un nouveau pétri. Placer un maximum de 50 œufs dans un pétri. Bien identifier les nouveaux pétris et les replacer en incubation.
- Désinfecter les œufs qui seront placés en élevage dans la colonie entre 8 à 24 heures post-fertilisation (voir annexe 2).

Points limites

- La durée de vie des reproducteurs est généralement de 18 mois. Plus ils sont utilisés intensément pour la reproduction, plus leur durée de vie diminue. Maintenir des reproducteurs au-delà de cet âge entraîne souvent une mauvaise gestion de l'espace et du temps technique et augmente les risques de maladie infectieuse.
- Les animaux en bonne santé pourraient être utilisés au-delà de ces limites de façon exceptionnelle dans les circonstances suivantes :
 - Lignée en péril ;
 - Validation des reproducteurs de la prochaine génération ;
 - Femelle dont le nombre d'œufs par ponte se maintient.
- Fournir une grille de points limites précise pour toute lignée ayant un phénotype nécessitant des soins particuliers.
- Utiliser la fiche d'observation des poissons génétiquement modifiés pour détecter de nouveaux phénotypes. Une grille de points limites pourra ensuite être produite et utilisée afin de réduire l'inconfort et la détresse pouvant être associés à ces traits phénotypiques.

Documentation

- Remplir adéquatement tous les cartons de bassin et les maintenir à jour.
- Noter toutes les informations relatives aux reproducteurs, naissances et animaux transférés sur protocole expérimental dans le cahier de suivi de la colonie afin que le responsable du LARSA puisse faire le suivi au CPA.
- Pour toute nouvelle lignée de poissons transgéniques, remplir la fiche d'observation des poissons génétiquement modifiés et la conserver dans le local d'hébergement.

Références

Harper, C. et Lawrence, C., *The laboratory zebrafish*. CRC Press. 254 p., 2011.

Westerfield, M., *The zebrafish book – A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 5th edition, University of Oregon Press, 2007.

Zebrafish Husbandry Association (ZHA). *In Vitro Fertilization Experimental Protocol*. Fourni par Dan Castranova. NIH. <http://zhaonline.org/protocol-database.html>

Zebrafish Husbandry Association. *Zebrafish Husbandry Education Workshop*. Documentation fournie par les formateurs en 2017.

Annexe 1

PRÉPARATION DE L'EAU UTILISÉE POUR LES ŒUFS

(traduit de Westerfield, 2007)

1. Préparer une solution stock de sels :
 - a. Peser 40 g d'Instant Ocean™
 - b. Mélanger le sel dans 1 litre d'eau distillée.

2. Pour préparer l'eau utilisée pour les œufs :
 - a. Prélever 1,5 ml de la solution stock de sels
 - b. Mélanger ce volume dans 1 litre d'eau distillée.
 - c. La concentration finale est de 60 µg/ml.

Il est également possible d'utiliser l'eau du système d'élevage préalablement autoclavée pour la gestion des œufs.

Annexe 2

DÉSINFECTION DES ŒUFS DE POISSONS-ZÈBRES

Plus les œufs sont jeunes (8 heures post-fertilisation), moins ils sont sensibles à une concentration plus élevée de chlore.

1. Préparer une solution de chlore à une concentration entre 50-100 ppm.
2. Placer les œufs à désinfecter dans cette solution pour 2 à 5 minutes en agitant.
3. Rincer les œufs avec de l'eau du système stérilisée ou l'eau préparée pour les œufs.
4. Au besoin, répéter pour un temps total de 5-10 minutes de contact.
5. Faire un rinçage final avec une solution de thiosulfate de sodium pour neutraliser tout chlore résiduel.
6. Rincer et placer dans un pétri avec de l'eau du système d'élevage autoclavée ou l'eau préparée pour les œufs (annexe 1). Remettre le pétri dans l'incubateur.

Annexe 3

MATÉRIEL REQUIS POUR LA FERTILISATION IN VITRO

- Microscope avec source lumineuse externe
- Pince à bout plat arrondie, en acier inoxydable (de type pince pour filtre membrane Millipore)
- Petite éponge avec une fente pour insérer le poisson
- Tubes capillaires en verre (dimension : 1.0 mm ID, 3'', paroi mince)
- Pipette de 20 µl avec embouts de plastique
- Glacière remplie de glace
- Tubes de PCR
- Plats de pétri
- Kimwipes ou papier absorbant
- Pipette de 1 ml (semi-automatique avec embout en plastique ou pipette de transfert en plastique)
- Marqueur pour identifier les pétris
- Solution anesthésiante de MS-222
- Solution saline de Hank (garder sur la glace)
- 4 bassins remplis avec l'eau du système (1 pour les mâles, 1 pour les femelles et 2 bassins de réveil)

Annexe 4

PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE HANK

(traduit de Westerfield, 2007)

Les solutions stock et la solution pré-mélangée peuvent être conservées au réfrigérateur pour plusieurs semaines, à l'exception de la solution de bicarbonate de sodium qui ne se conserve pas bien et doit être préparée fraîchement.

Solution stock #1

- 8 g NaCl
- 0,4 g KCl
- 100 ml eau double distillée

Solution stock #2

- 0,358 g Na₂HPO₄ anhydre
- 0,600 g KH₂PO₄
- 100 ml eau double distillée

Solution stock #3

- 0,72 g CaCl₂
- 50 ml eau double distillée

Solution stock #4

- 1,23 g MgSO₄·7H₂O
- 50 ml eau double distillée

Solution stock #5 (à faire uniquement avant l'utilisation de la solution, ne pas conserver)

- 0,35 g NaHCO₃
- 10 ml eau double distillée

Solution Hank pré-mélangée

Mélanger les solutions stock en respectant l'ordre suivant :

1. 10 ml solution #1
2. 1 ml solution #2
3. 1 ml solution #3
4. 86 ml eau double distillée
5. 1 ml solution #4

Solution finale de Hank

- Prélever 9,9 ml de solution Hank pré-mélangée
- Ajouter 0,1 ml de la solution stock #5 fraîche