



UNIVERSITÉ
LAVAL

Direction des services vétérinaires

Procédure normalisée de fonctionnement

Objet : Génotypage de poissons-zèbres transgéniques	Numéro : TS-1b
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).	
Rédigée par : <i>La DSV</i>	Date : 17 octobre 2025
Révisée par : <i>La DSV en collaboration avec les animaleries du CERVO et du LARSEM</i>	Date : 26 novembre 2025
Approuvée par : <i>CPAUL-1</i>	Date : 10 décembre 2025
But : Décrire la procédure de génotypage chez le poisson-zèbre transgénique.	Version 1

Généralités

- Le génotypage sert à déterminer la composition génétique d'un animal modifié génétiquement. (*Tiré des Lignes directrices du CCPA : les poissons-zèbres et autres petits poissons d'eaux chaudes utilisés en laboratoire*)
- Lorsque l'étude le permet, les techniques moins invasives, comme le badigeonnage de la peau, doivent être priorisées.
- Un génotypage par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) requiert moins d'ADN qu'un *Southern Blot*.
- Des biopsies répétées nécessitent une justification auprès du CPAUL.
- Il est possible d'héberger seul un individu qui n'est pas identifié et qui n'est pas distinguable des autres individus pour une courte période après la procédure, le temps d'avoir les résultats du génotypage.
- Si les animaux sont hébergés dans des bassins statiques suite à la procédure, il est important de respecter les conditions suivantes :
 - Changement d'eau minimalement 2 fois par jour ou plus, selon la qualité de l'eau;
 - Nourrir les poissons uniquement avec des artémies, car la moulée réduit la concentration en oxygène de l'eau.

Méthodes et procédures pour les larves

Biopsie de la nageoire caudale à 3 jours post-fertilisation (dpf)

- Anesthésier les larves dans une solution de Syncaïne® diluée à 160 mg/L, selon la PNF A-13 *Anesthésie des poissons*.
- Prendre une larve anesthésiée et la placer sous un binoculaire de façon à ce qu'elle soit immobile.
- Retirer le surplus d'eau se trouvant autour de la larve avec une micropipette en s'assurant de laisser la larve humide en tout temps.
- Avec une lame de microscalpel, couper le bout de la queue distale à la circulation sanguine, d'un côté pigmenté à l'autre.

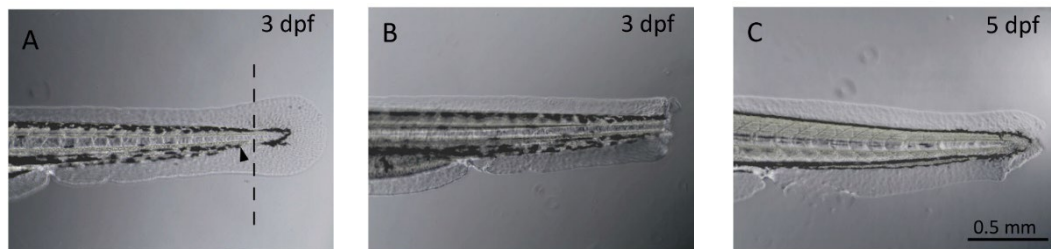


Image tirée de Kosuta C et al. High-throughput DNA Extraction and Genotyping of 3dpf Zebrafish Larvae by Fin Clipping.

- Déposer l'échantillon prélevé dans une plaque de puits pour le génotypage et déposer la larve dans une 2^e plaque de puits. La larve demeurera dans cette plaque jusqu'à l'obtention des résultats. Placer la larve et l'échantillon pour le génotypage dans les puits correspondants.

Phénotypage par microscopie des lignées avec marqueur fluorescent

- Au besoin, anesthésier les larves dans une solution de Syncaïne® diluée de 100 à 160 mg/L, selon la PNF A-13 *Anesthésie des poissons*. Utiliser la concentration efficace la plus faible possible.
- Observer la fluorescence des larves anesthésiées par microscopie optique sous une lumière UV.
- La confirmation du génotype une fois adulte peut être nécessaire dans certains cas.

Zebrafish Embryonic Genotyper (ZEG)

- Ouvrir le couvercle de l'appareil, retirer le couvercle de la plateforme et bien placer la plaquette qui recevra les larves sur la plateforme, en ayant préalablement retiré sa pellicule protectrice.
- Avec une pipette adéquate pour manipuler les larves, placer une larve par chambre.

- Une fois toutes les larves placées, repositionner le couvercle de la plateforme et fermer ensuite le couvercle de l'appareil.
- Démarrer l'appareil et sélectionner les paramètres désirés. Laisser l'appareil faire son cycle de vibration pendant 7,5 minutes.
- Une fois le cycle terminé, ouvrir le couvercle de l'appareil et retirer à nouveau le couvercle de la plateforme.
- Prélever le liquide présent dans la chambre autour de la larve en évitant de toucher à celle-ci. Déposer le liquide prélevé dans un tube à prélèvement. Utiliser un tube et un embout de pipette par larve pour éviter toute contamination. Faire cette étape pour toutes les chambres de la plateforme contenant des larves.
- Replacer du liquide dans les chambres et transférer les larves dans une plaque de puits.
- Retirer la plaquette qui contenait les larves, replacer le couvercle de la plateforme et refermer le couvercle de l'appareil.

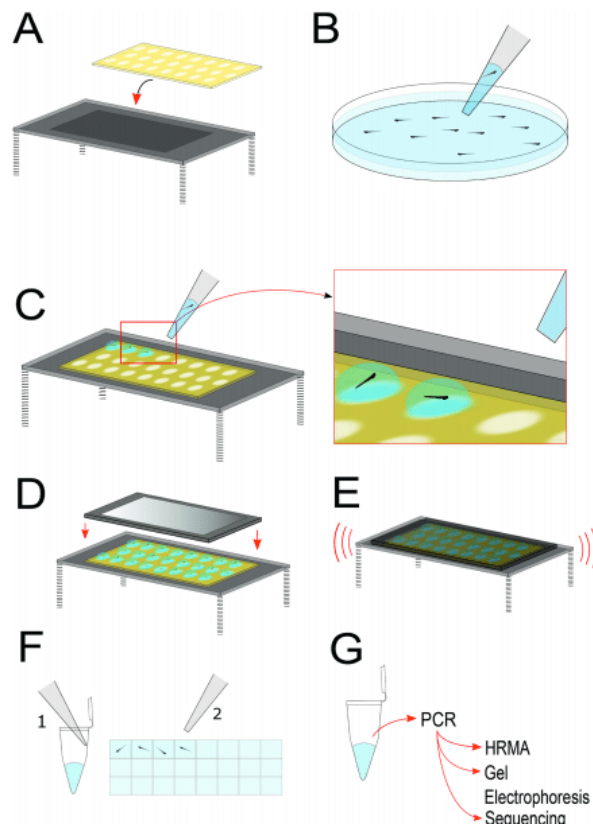


Image tirée de Danio Lab. *The Zebrafish Embryonic Genotyper (ZEG)*, <https://daniolab.com/our-products/the-zebrafish-embryonic-genotyper-zeg/>

Méthodes et procédures pour adultes

Biopsie de la nageoire caudale

Cette méthode peut causer de la souffrance et de la détresse chez l'animal étant donné le degré d'invasion de la procédure (capture, manipulation, anesthésie, biopsie, etc.).

- S'assurer de coordonner le moment des prélèvements avec l'analyse des échantillons puisque les animaux devront rester isolés le temps de recevoir les résultats.
- Faire la procédure dans un endroit propre et porter des gants.
- Anesthésier les poissons dans une solution de Syncaïne® diluée à 160 mg/L, selon la PNF A-13 *Anesthésie des poissons*.

Note : Toujours tamponner l'eau d'anesthésie avec du bicarbonate de sodium.

- Prélever un maximum de 2 à 3 mm de la nageoire caudale avec une lame de scalpel, une lame de rasoir ou une paire de ciseaux stériles, en faisant attention de ne pas nuire à sa future capacité de locomotion.
- Réveiller l'animal individuellement dans un bassin de réveil identifié contenant 5 mg/L de lidocaïne pendant 2 à 5 minutes.
- Nettoyer, désinfecter/stériliser ou changer les outils entre chaque animal en plus de nettoyer et de désinfecter la surface à chaque fois.

Badigeonnage de la peau

Cette méthode ne requière pas d'anesthésie et elle est peu invasive. Elle comporte cependant certains risques de contamination croisée.

- Capturer un animal à l'aide d'un filet, le déposer sur une surface mouillée. Le stabiliser à l'aide de l'index et du pouce, et à l'aide du filet si désiré.
- Frotter doucement le bout d'un coton-tige stérile dans le sens des écailles, en débutant derrière les branchies jusqu'au bout de la queue, pour récolter suffisamment d'ADN par le mucus de la peau.

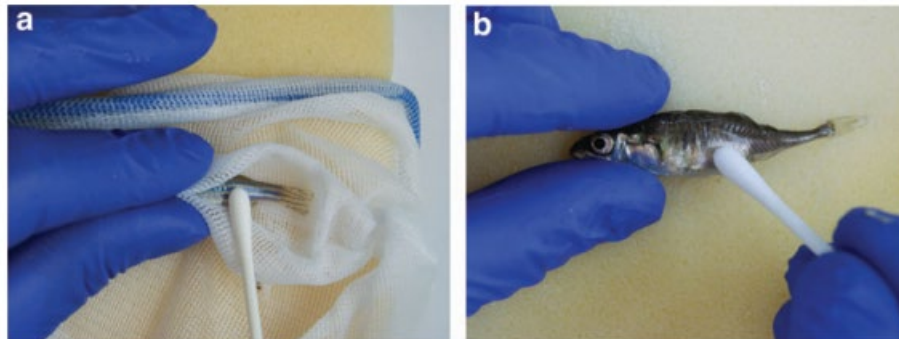


Image tirée de Breaker, Carle et al. *A Low-Cost Method of Skin Swabbing for the Collection of DNA Samples from Small Laboratory Fish*. ZEBRAFISH, Vol.14, Number 1, 2017.

Phénotypage par microscopie des lignées avec marqueur fluorescent

- Anesthésier les poissons dans une solution de Syncaïne® diluée de 100 à 160 mg/L, selon la PNF A-13 *Anesthésie des poissons*. Utiliser la concentration efficace la plus faible possible.
- Observer la fluorescence des poissons anesthésiés par microscopie optique sous une lumière UV.

Références

Breaker C et al. *A Low-Cost Method of Skin Swabbing for the Collection of DNA Samples from Small Laboratory Fish*. ZEBRAFISH, Vol.14, Number 1, 2017.

CCPA, *Lignes directrices du CCPA : les poissons-zèbres et autres petits poissons d'eaux chaudes utilisés en laboratoire*, 2020.

D'Angelo L and De Girolamo P (eds) (2022) *Laboratory fish in biomedical research: biology, husbandry and research applications for zebrafish, medaka, killifish, swordtail fish, cavefish, stickleback, goldfish and danionella translucida*. London: Academic Press.

Danio Lab. *The Zebrafish Embryonic Genotyper (ZEG)*, <https://daniolab.com/our-products/the-zebrafish-embryonic-genotyper-zeg/>

Kosuta C et al. *High-throughput DNA Extraction and Genotyping of 3dpf Zebrafish Larvae by Fin Clipping*. J Vis Exp. 2018 Jun 29;(136):58024.

NC3RS, *Skin swabbing for DNA sampling of zebrafish*. <https://www.nc3rs.org.uk/skin-swabbing-dna-sampling-zebrafish> (page consultée en février 2023).

RSPCA Animals in Science Department, *Refined methods of DNA collection in fishes*, September 2021.

Schroeder PG, Sneddon LU. *Exploring the efficacy of immersion analgesics in zebrafish using an integrative approach*, Applied Animal Behaviour Science 187 (2017); 93-102.