

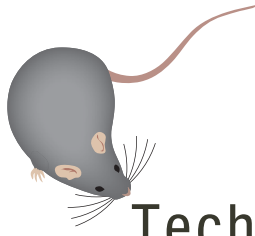
Techniques d'ingénierie reproductive de la Souris

Manuel Technique

Naomi Nakagata

Version française
Fabien Delerue





Techniques d'Ingénierie Reproductive de la **Souris**

Manuel Technique

Naomi Nakagata

En collaboration avec Shuuji Tsuchiyama

Division d'ingénierie reproductive

Centre de Ressources Animales et de Développement (CARD)

Université de Kumamoto, Japon

Version française : Fabien Delerue

3ème édition

Publié par COSMO BIO CO., LTD.

Toyo-Ekimae Bldg., 2-20, Toyo 2-Chome, Koto-ku, Tokyo 135-0016,
Japon

Téléphone; +81-3-5632-9617

Conception de la couverture: COSMO BIO CO., LTD.

Droits d'auteur© 2018 Naomi Nakagata

TOUS DROITS RESERVES. IMPRIME AU JAPON

Ce manuel n'est pas destiné à la vente.

La reproduction (même partielle), la sauvegarde dans un système de données ou la transmission sous quelque forme ou par n'importe quel moyen électronique, mécanique, par photocopie, enregistrement ou autres, sont strictement interdites sans accord préalable de l'auteur.

Préface

Ces dernières années, la production de souris génétiquement modifiées s'est largement accrue. De plus, les progrès réalisés dans le domaine des techniques d'altération des génomes (par TALEN et CRISPR/Cas9) appliquées en biologie moléculaire sont sans précédent. A tel point qu'une lignée de souris génétiquement modifiées est désormais aisément produite en quelques mois. Une telle production a largement été rendue possible grâce à l'apport de techniques d'ingénierie reproductive de la souris telles que la fécondation *in vitro*, la congélation d'embryons et de sperme, et les techniques de transfert d'embryons. Ces techniques périphériques sont devenues incontournables, et leur utilisation ne cesse d'augmenter.

Par conséquent, plusieurs manuels techniques faisant référence à certaines techniques d'ingénierie reproductive de la souris ont été publiés, mais il n'existe pas encore de manuel complet décrivant en détail toutes les techniques de pointe nécessitant l'utilisation de microscope stéréoscopique.

C'est dans cette optique que nous avons créé ce manuel de techniques d'ingénierie reproductive de la souris, dans un souci de compréhension par tous. Ce manuel contient de nombreuses illustrations graphiques, photos et vidéos, et les explications étape par étape qui les accompagnent se veulent les plus complètes possibles, dans un souci de clarté. Nous espérons que ce manuel deviendra le guide de référence pour tous les étudiants, techniciens, chercheurs, ou toute personne désireuse d'étudier les techniques d'ingénierie reproductive de la souris.

Naomi Nakagata

TABLE DES MATIERES

Chapitre 1 Fécondation *In Vitro* (FIV)

1-1	Préparation et assemblage de pipettes pour la manipulation d'embryons	4
1-2	Fécondation <i>In Vitro</i> (FIV)	6
1-3	Fécondation <i>In Vitro</i> (FIV) après Ultra-Superovulation	12

Chapitre 2 Transport de sperme

2-1	Collection et transport réfrigéré de queues d'épididymes	14
2-2	Fécondation <i>In Vitro</i> avec sperme épидидymaire réfrigéré	18

Chapitre 3 Congélation de sperme

3-1	Congélation de spermatozoïdes murins	20
3-2	Fécondation <i>In Vitro</i> avec spermatozoïdes congelés	26
3-3	Méthode de ressuscitation de lignées par Fécondation <i>In Vitro</i> avec spermatozoïdes congelés	32

Chapitre 4 Préparation d'ovocytes & d'embryons

4-1	Préparation d'ovocytes microdisséqués au Laser	36
4-2	Dissection Partielle de la membrane Pellucide (DPP)	39
4-3	Collection d'embryons au stade 2 cellules	42

Chapitre 5 Transport d'ovocytes & d'embryons

5-1	Transport d'embryons réfrigérés au stade 2 cellules	46
5-2	Transport réfrigéré d'oviductes de souris contenant des embryons au stade 2 cellules	52

Chapitre 6 Congélation d'ovocytes & d'embryons

6-1	Vitrification simple d'embryons murins	54
6-2	Vitrification simple d'ovocytes murins	59
6-3	Vitrification et transport d'ovaires de souris	62

Chapitre 7 Autres techniques

7-1	Vasectomie pour la production de males stériles	64
7-2	Transfert d'embryons dans l'oviducte	66
7-3	Transfert utérin d'embryons	72
7-4	Césarienne et adoption	76

Chapitre 8 Milieux

8-1	Stockage de milieux et solutions en ampoules sous atmosphère azotée	78
8-2	Tableaux de composition des milieux	79

*  voir détails en page 90

1-1 Préparation et assemblage de pipettes pour la manipulation d'embryons

Matériel et Equipement

1. Capillaires en verre (Micropipettes calibrées; 2-000-200; Compagnie Scientifique Drummond, USA)
2. Lampe à pétrole (ou bec benzène No. RK4102; REKROW INDUSTRIAL INC.)
3. Lime
4. Hématimètre
5. Pipette Pasteur
6. Cotton
7. Tube en silicone
8. Bouchon en silicone
9. Aspirateur buccal

Procédure

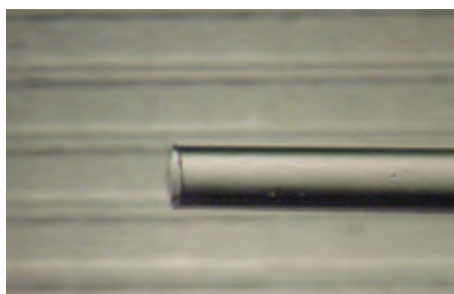
Nettoyage et stérilisation des capillaires en verre

1. Immerger les capillaires en verre dans un mélange (99:1) d'éthanol à 70% et d'acide hydrochlorique concentré pendant au moins 12 heures.
2. Rincer les capillaires en verre à l'eau courante pendant au moins 3 heures.
3. Rincer les capillaires en verre 4 ou 5 fois à l'eau distillée.
4. Stériliser les capillaires en verre à 180°C pendant au moins 3 heures.

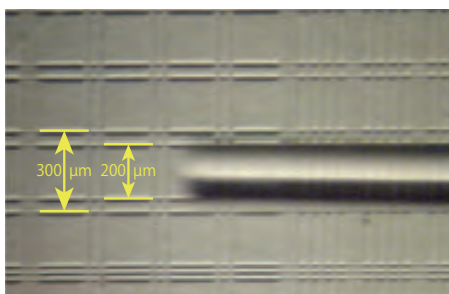
Préparation de pipettes pour la manipulation d'embryons

1. Chauffer le centre du capillaire en verre en utilisant la partie supérieure de la flamme de la lampe à pétrole. Dès que le verre commence à fondre, retirer le capillaire de la flamme et immédiatement étirer le capillaire en tirant simultanément sur les deux bouts.
2. Placer le centre du capillaire (partie fine étirée) dans la flamme et laisser fondre jusqu'à obtenir deux morceaux.
3. Ajuster la longueur du capillaire à environ 10 cm en faisant une entaille sur la partie étirée du capillaire avec une lime, puis en appuyant sur l'extrémité du capillaire pour la briser.
4. Vérifier le diamètre du bout du capillaire en utilisant un hématimètre sous le microscope.

[Lorsque le bord du capillaire est en focus]



[Lorsque l'hématimètre est en focus]



[Fabrication de pipettes pour la manipulation d'embryons] No. 01-01



Note

Capillaires et aspirateurs buccaux pré-assemblés pour la manipulation d'embryons sont disponibles à la vente chez Cosmo Bio Co., Ltd. (Embryo manipulation instrument set, Cat. No. KYD-S036)

Note

Les dimensions du capillaire dépendent du temps passé dans la flamme et du timing utilisé pour étirer le capillaire.

La fabrication de capillaires aux dimensions constantes requiert un peu de pratique.

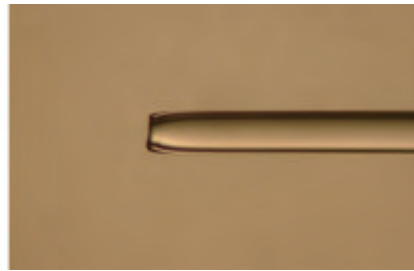
Le diamètre externe du capillaire une fois étiré doit atteindre approximativement 200-250 μm.

- Polir et stériliser le bout du capillaire en le passant très rapidement dans la flamme. Prendre soin de ne pas rester trop longtemps dans la flamme pour ne pas boucher le capillaire.

[Bout du capillaire avant polissage]



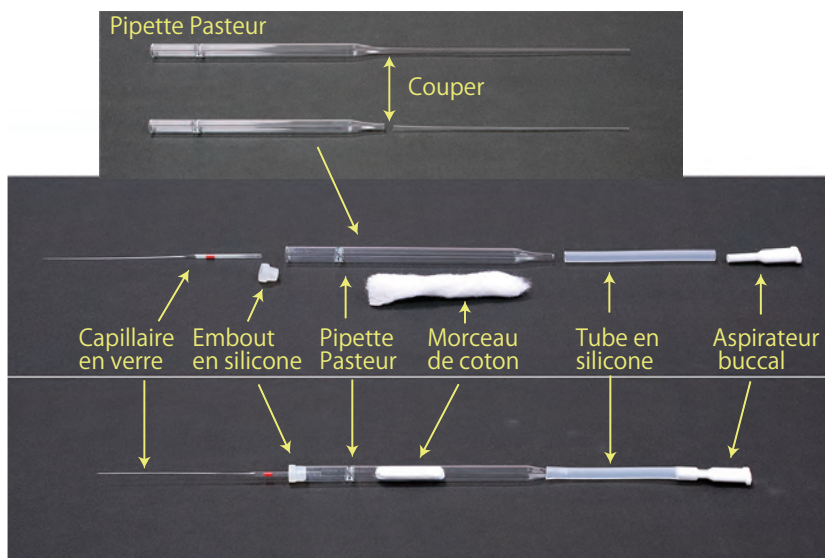
[Bout du capillaire une fois poli]

[Polissage du bout du capillaire] No. 01-02 

Assemblage des capillaires avec l'aspirateur buccal pour la manipulation d'embryons

- Couper le bout du capillaire avec une lime (en laissant approximativement 1 cm).
- Polir le bout du capillaire en le passant dans la flamme de la lampe à pétrole.
- Insérer un morceau de coton dans le capillaire.
- Insérer le bouchon en silicone du côté le plus large du capillaire.
- Enfiler un tube en caoutchouc du côté le plus fin du capillaire.
- Couper le tube en caoutchouc à une longueur convenable, et fixer l'aspirateur buccal au bout du tube.

[Capillaire et aspirateur buccal pour la manipulation d'embryons]



Manipuler les embryons

- Placer l'aspirateur buccal en bouche.
- Sous le microscope, placer le bout du capillaire dans une goutte de milieu. Laisser le liquide monter dans le capillaire par capillarité.
- Lorsque le liquide cesse de monter par capillarité, aspirer avec précaution les embryons. Pour déposer les embryons, souffler avec précaution dans le capillaire.

[Manipulation d'embryons] No. 01-03 

1-2 Fécondation *In Vitro* (FIV)

Matériel et équipement

1. PMSG (Sérum de Gonadotrophine de jument enceinte Cat. No. 80056-608; VWR SCIENTIFIC INC.) (37.5UI/mL en solution saline stérile)
2. hCG (Gonadotrophine Chorionique humaine, CG-10; Sigma) (37.5UI/mL en solution saline stérile)
3. Seringue à usage unique 1mL
4. FERTIUP® (Milieu de Préincubation: PM, Cat. No. KYD-002-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
5. CARD MEDIUM® (Cat. No. KYD-003-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
6. mHTF (Fluide tubal humain modifié)
7. Paraffine liquide
8. Micropipettes
9. Embouts de pipettes pour la préparation des boîtes de culture
10. Embouts de pipettes pour insémination (Pipette Tip Cat. No.114; Quality Scientific Plastics)
11. Boîtes de Pétri en plastique (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
12. Ciseaux de précision
13. Une paire de forceps watchmaker's #5
14. Ciseaux à micro-ressorts (lame de 5mm)
15. Aiguille de dissection
16. Papier filtre
17. Capillaires en verre pour manipulation d'embryons
18. Microscope
19. Etuve humidifiée (37°C, 5% CO₂)

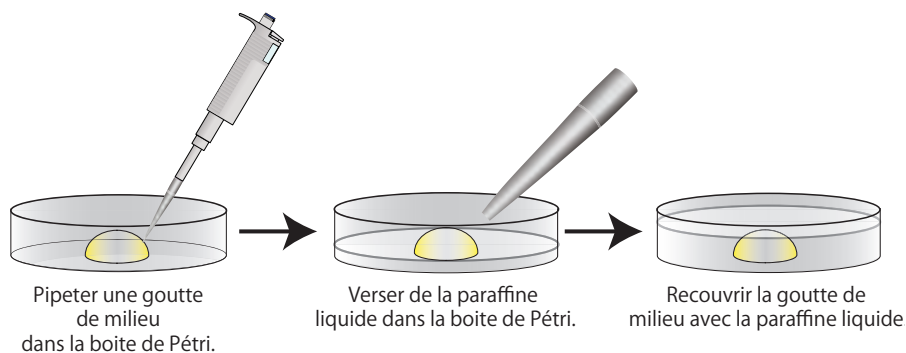
Procédure

Superovulation

1. Induire la superovulation avec 7.5UI de sérum de jument (PMSG) par femelle mature (âgées de 8-12 semaines) par injection intrapéritonéale (i.p.). (Le sérum de jument est en général injecté durant la phase lumineuse du cycle, entre 14h00 et 18h00).
2. 48 à 52 heures plus tard, injecter 7.5UI de Gonadotrophine humaine (hCG) par voie intrapéritonéale.

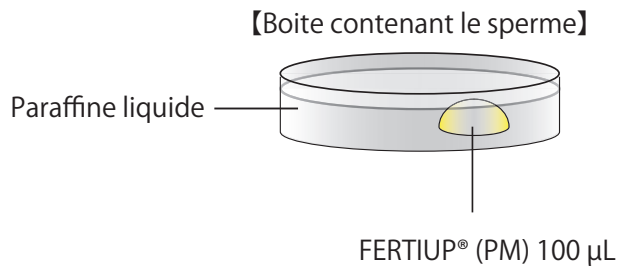
Préparation de boîtes de culture

1. Préparer les boîtes de culture comme indiqué ci-dessous and placer-les dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) pour équilibrer les milieux de culture.



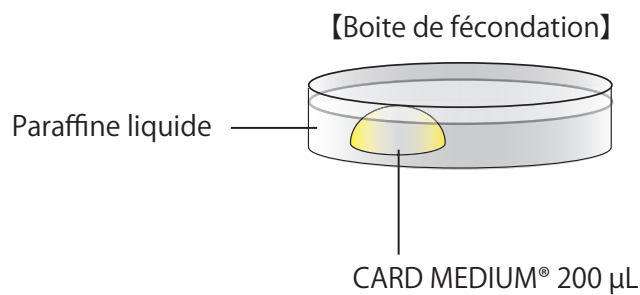
a. Boîte contenant le sperme

Placer 1 goutte (100 μL / goutte) de FERTIUP® (PM) dans une boîte de Pétri et recouvrir avec de la paraffine liquide 30 minutes avant de collecter le sperme, puis placer la boîte dans l'étuve.



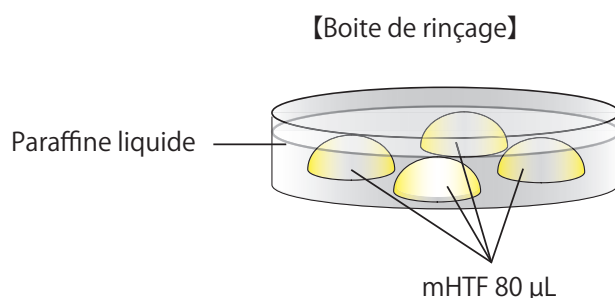
b. Boîte de fécondation

Placer 1 goutte (200 μL / goutte) de CARD MEDIUM® dans une boîte de Pétri et recouvrir avec de la paraffine liquide 10 minutes avant de collecter les ovocytes, puis placer la boîte dans l'étuve.



c. Boîte de rinçage

Placer 4 gouttes (80 μL / goutte) de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrir avec de la paraffine liquide. Placer la boîte dans l'étuve 30 minutes minimum.

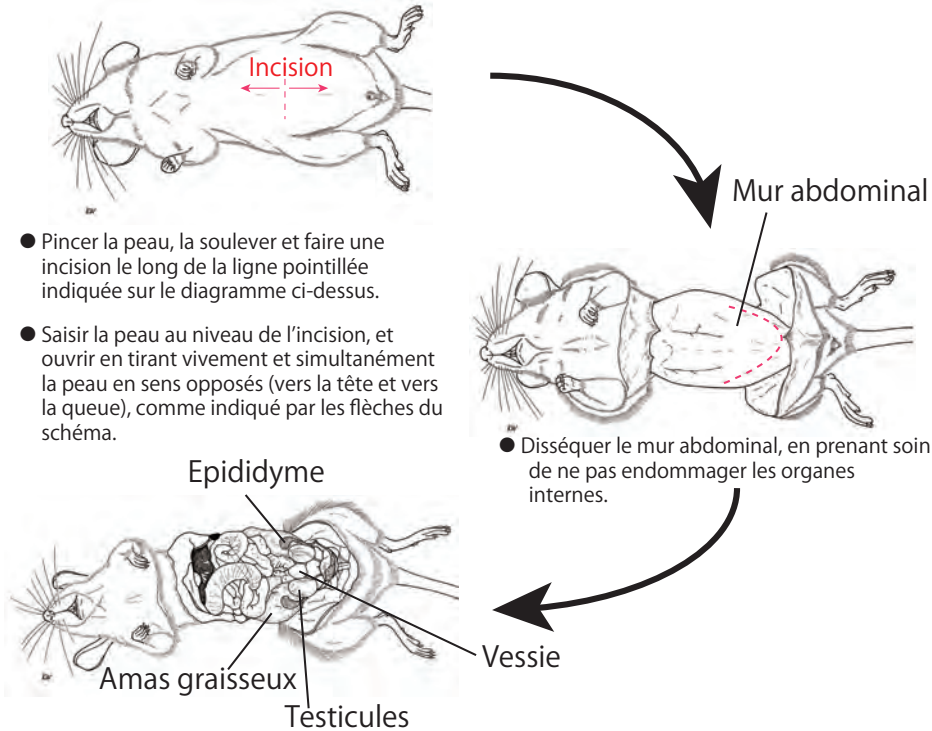


Note

Il y a trois méthodes différentes pour préparer le CARD MEDIUM®, selon que la fécondation *in vitro* est faite à partir de sperme frais, congelé, ou réfrigéré. Reportez-vous au manuel d'instruction du CARD MEDIUM® pour plus de détails.

Collection de spermatozoïdes

1. Sacrifier un ou deux males matures (âgés de 3 à 6 mois) et disséquer leurs queues d'épididymes en évitant au maximum de prélever graisse, sang ou autres fluides.
2. Placer l'échantillon sur du papier filtre pour se débarrasser de fluides potentiels.



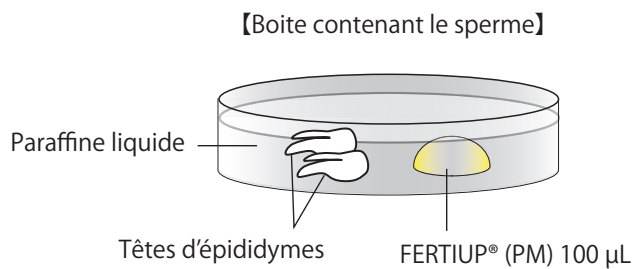
- Pincer la peau, la soulever et faire une incision le long de la ligne pointillée indiquée sur le diagramme ci-dessus.
- Saisir la peau au niveau de l'incision, et ouvrir en tirant vivement et simultanément la peau en sens opposés (vers la tête et vers la queue), comme indiqué par les flèches du schéma.

- Disséquer le mur abdominal, en prenant soin de ne pas endommager les organes internes.

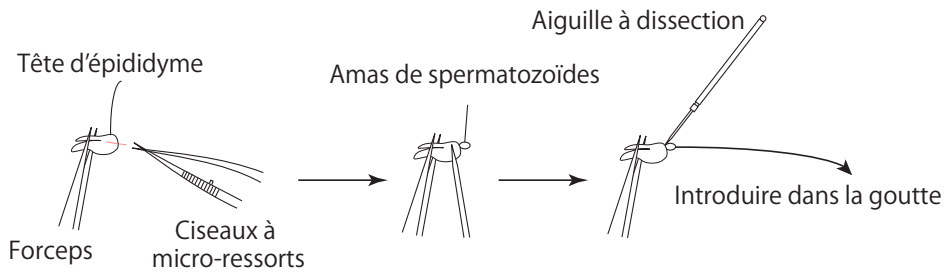
[Prélever les têtes d'épididymes] No. 02-01



3. Placer les queues d'épididymes dans la goutte de FERTIUP® (PM) (boîte contenant le sperme).



4. Disséquer le canal de chaque queue d'épididyme avec les ciseaux à micro-ressorts, puis presser doucement sur la surface des queues d'épididymes avec l'aiguille de dissection pour faire sortir le sperme.
5. Avec l'aiguille de dissection, introduire les amas de spermatozoïdes (expulsés des queues d'épididymes) dans la goutte de FERTIUP® (PM).

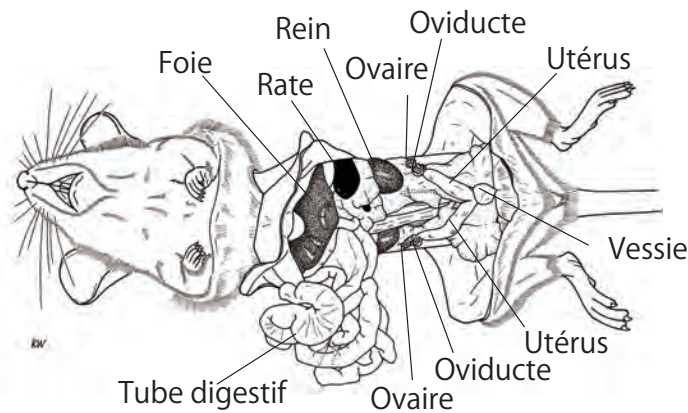


[Expulser les spermatozoïdes] No. 02-02

- Placer la suspension dans l'étuve (37 °C, 5% CO₂) pendant 60 minutes pour permettre au sperme de féconder les ovocytes avant insémination.

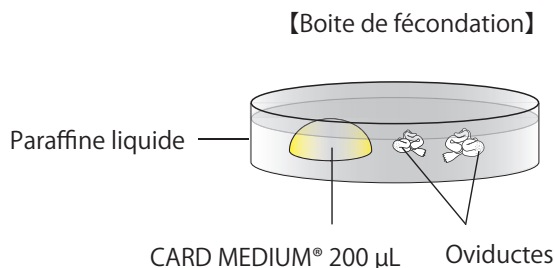
Collection des Ovocytes

- Sacrifiez une femelle superovulée mature (âgée de 8 à 12 semaines) approximativement 15-17 heures après administration de Gonadotrophine humaine (hCG).
- Disséquez la souris pour exposer la cavité abdominale.
- Poussez l'appareil digestif sur le côté pour exposer les utérus, oviductes, et ovaires.
- Prélevez les utérus, oviductes, et ovaires et placez-les sur le papier filtre stérile.
- Disséquez les oviductes, en se débarrassant au maximum des graisses, sang, et autres fluides.



[Prélever les oviductes] No. 02-03

- Immergez les oviductes dans la paraffine liquide de la boîte de fécondation.



Note

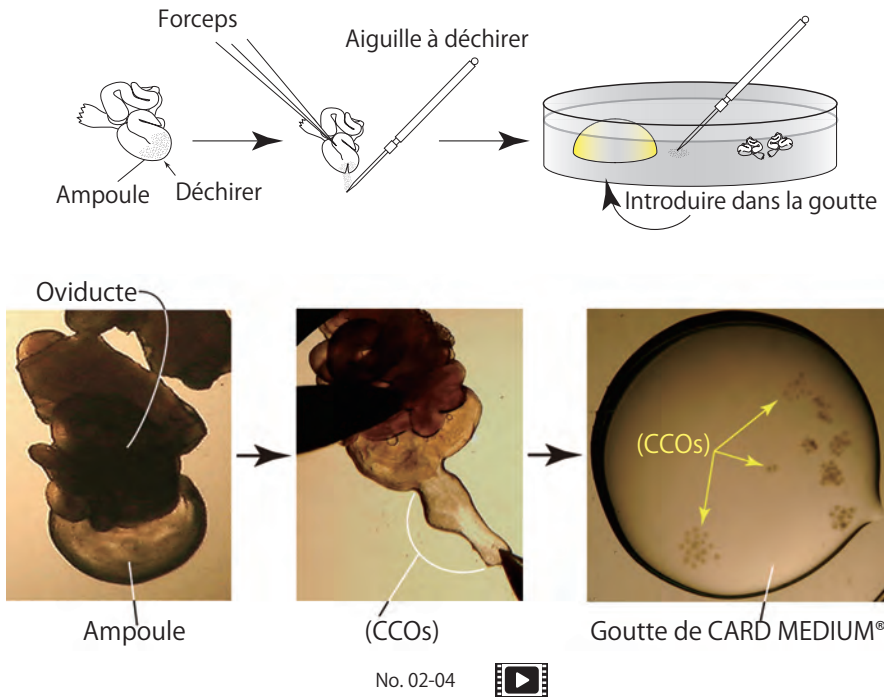
Le degré de fertilité varie énormément selon le type de spermatozoïdes utilisés.

Les spermatozoïdes les plus fertiles peuvent être observés à la périphérie de la goutte de milieu de culture, après avoir procédé à des mouvements de rotation de la boîte de Pétri.

A contrario, les spermatozoïdes les moins fertiles sont peu mobiles et non homogènes.

- Maintenez chaque oviducte en position fixe au fond de la boîte de Pétri avec un forceps, et déchirez l'ampoule avec l'aiguille de dissection pour faire sortir les complexes cumulus-ovocytes (CCOs). Déplacez les CCOs dans la goutte de CARD MEDIUM® (200 µL).

[Introduire les Complexes Cumulus-Ovocytes (CCOs) dans une goutte de CARD MEDIUM®]



Note

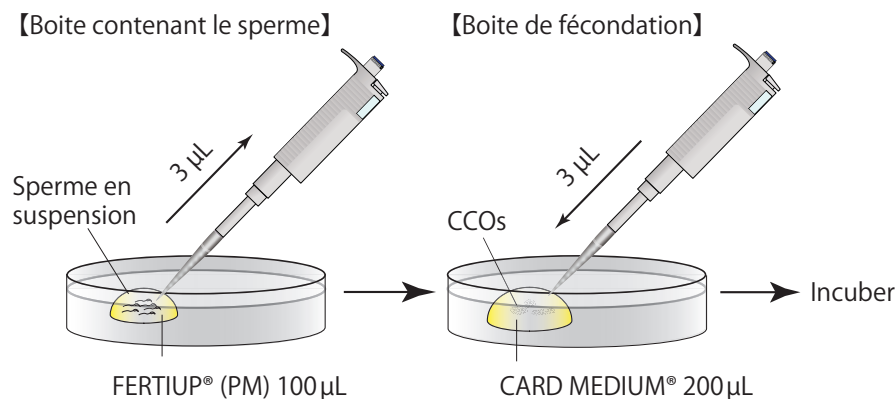
Assurez-vous d'effectuer toutes les opérations, depuis l'abatage des femelles et la collecte des oviductes jusqu'à l'immersion des CCOs dans la goutte de CARD MEDIUM® en un minimum de temps (30 secondes maximum).

Si vous effectuez la procédure sans assistance, assurez-vous de ne pas sacrifier plusieurs souris à la fois. Il est préférable de n'abattre qu'une souris et prélever ses oviductes rapidement avant de procéder à la dissection de la souris suivante.

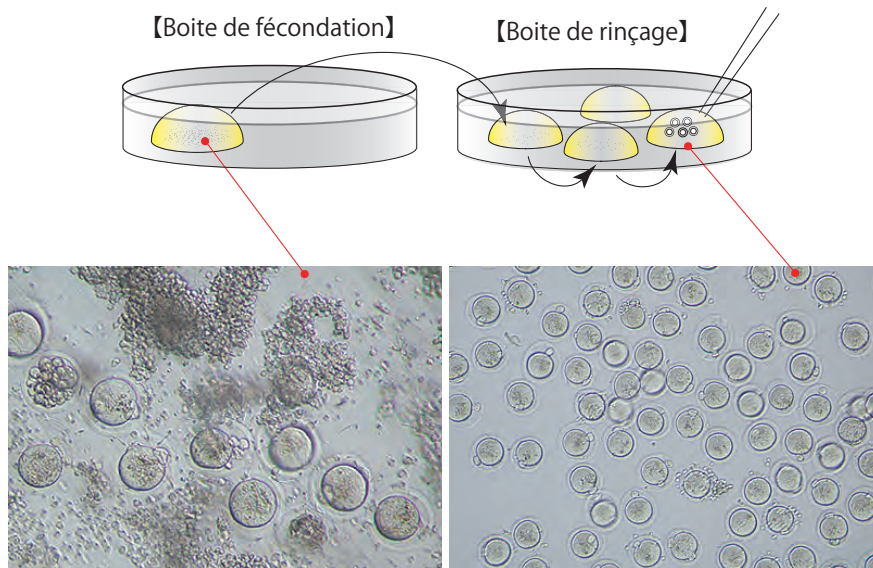
- Maintenez la boîte de fécondation avec les CCOs dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) pendant 30-60 minutes avant insémination.

Insémination

- Pipetez (embouts de pipettes Cat. No.114; Quality Scientific Plastics) un volume approprié (en général 3 µL) de sperme en suspension dans la goutte de CARD MEDIUM® contenant les CCOs.
- Placez la boîte de fécondation dans l'étuve (37°C, 5% CO₂).

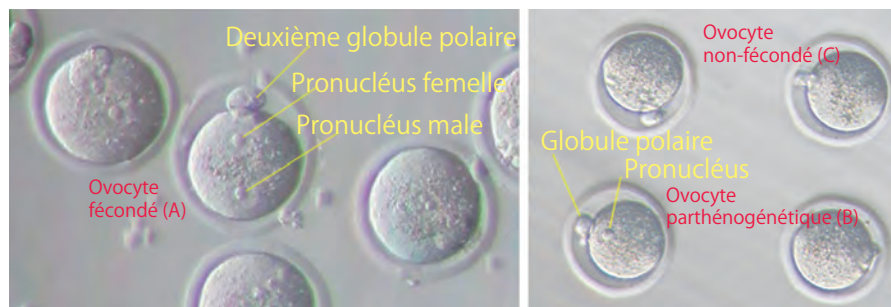


3. 3 heures après insémination, rincez les ovocytes 3 fois dans du mHTF frais (80 μ L) de la boîte de rinçage, en évitant de transférer du CARD MEDIUM®.

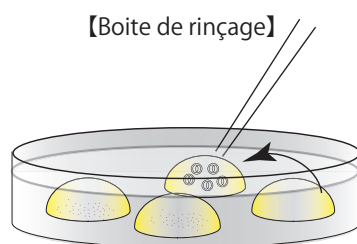


4. 6 heures après insémination, observez les ovocytes dans la 3ème goutte de mHTF et éliminez tout ovocyte parthénogénétique (n'ayant qu'un seul pronucléus).

[Apparence des ovocytes fécondés, non-fécondés, ou parthénogénétiques]



5. Après une nuit de culture, transférez uniquement les embryons ayant atteint le stade 2 cellules dans la 4ème goutte de mHTF de la boîte de rinçage. Ces embryons peuvent être vitrifiés, réimplantés, ou cultivés jusqu'au stade blastocyste. (Reportez-vous aux chapitres Vitrification rapide d'embryons murins en page 54 et Réimplantation d'embryons dans l'oviducte en page 66).



Références

1. Toyoda Y., Yokoyama M., and Hosi T. 1971. Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. *Jpn. J. Anim. Reprod.* **16**: 147-151.

Note

Lors de cette étape, il est important de repérer les ovocytes parthénogénétiques et des les éliminer.

Si cette étape est occultée, les ovocytes parthénogénétiques auront atteint le stade deux-cellules dès le lendemain, et il sera alors impossible de les distinguer des ovocytes fécondés.

Note

Un ovocyte fécondé a deux pronucléi, un male et un femelle (A). Au contraire, un ovocyte parthénogénétique n'a qu'un pronucléus (B) et un ovocyte non fécondé n'a pas de pronucléus (C).

1-3 Fécondation *In Vitro* (FIV) après ultra-superovulation

Matériel and Equipement

1. Agent d'Ultra-superovulation (CARD HyperOva®)
2. Le reste du matériel est similaire à celui utilisé pour la FIV avec sérum de jument (PMSG). Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 6.

Procédure

Ultra-superovulation

1. Induire la superovulation par injection intrapéritonéale de 0.1 à 0.2mL de CARD HyperOva® sur une femelle âgée de 26 à 30 jours (le jour de naissance est compté comme Jour 0).
2. 48 heures plus tard, procéder à une injection intrapéritonéale de 7.5UI de gonadotrophine humaine (hCG).

Préparation des boîtes de Pétri et collection de spermatozoïdes

1. Préparer les boîtes de Pétri et collecter les spermatozoïdes de manière similaire à celle de la FIV avec sérum de jument (PMSG). Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 6.

Collection des ovocytes

Après injection de CARD HyperOva®, les oviductes des femelles superovulées enflent de manière significative. Prenez donc soin de les manipuler avec précaution en suivant la méthode décrite ci-dessous pour ne pas les endommager.

1. Retirer les oviductes (avec ampoules) de la cavité abdominale des femelles.
2. Placer les oviductes rapidement sur du papier filtre stérile pour éliminer l'excès de sang et fluides.
3. Immerger les oviductes dans la paraffine liquide de la boîte de fécondation.
4. Utiliser une goutte de CARD MEDIUM® (200 µL) par femelle (2 oviductes).

Procéder aux étapes suivantes comme indiqué au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 9.

Insémination

1. Pour l'insémination, pipeter 6 µL de sperme en suspension (pré-incubé de manière identique à la FIV avec sérum de jument – PMSG).

Les autres procédures relatives à l'insémination sont décrites au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 10.

Références

1. Takeo T., Nakagata N. 2015. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice. *PLoS ONE* 10(5): e0128330. doi:10.1371/journal.pone.0128330
2. Takeo T., Nakagata N. 2016. Immunotherapy using inhibin antiserum enhanced the efficacy of equine chorionic gonadotropin on superovulation in major inbred and outbred mice strains. *Theriogenol.* doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.076

2-1 Collection et transport réfrigéré de têtes d'épididymes

Matériel and Equipement

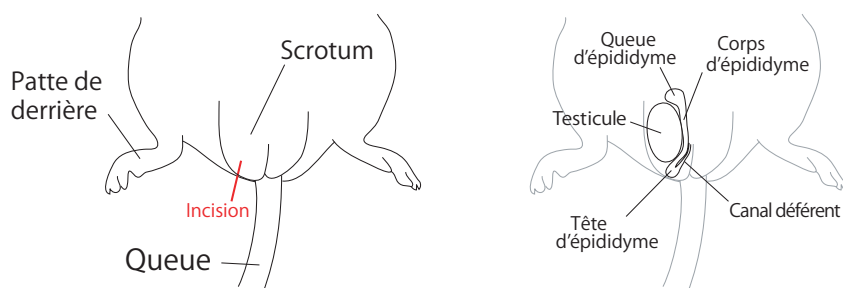
1. Souris male (âgée de 12 semaines)
2. Anesthésiants
3. Plaque chauffante (37°C)
4. Ciseaux de précision
5. Une paire de forceps watchmaker's #5
6. Clips de suture (Autoclip 9 mm; Clay Adams 427631) et applicateur de clips (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams 427630)
7. Moniteur de température (Thermochron iButton Cat. No. DS1921G; Maxim Integrated Products)
8. Solution pour transport réfrigéré de têtes d'épididymes (Cat. No. KYD-007-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
9. Kit de transport réfrigéré CARD (Cat. No. KYD-006-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
 - Thermos (Cat. No. JMK-501; Thermos K.K.)
 - Boîte en papier (pouvant contenir des tubes de 0.2mL)
 - Un morceau de coton
 - Blocs réfrigérants (petits et grands)
 - Conteneur de transport en Polystyrène (Cat. No. KC-3, KARUX)

Le kit de transport CARD et la solution de préservation doivent tous les deux être réfrigérés à 4-8°C avant utilisation.

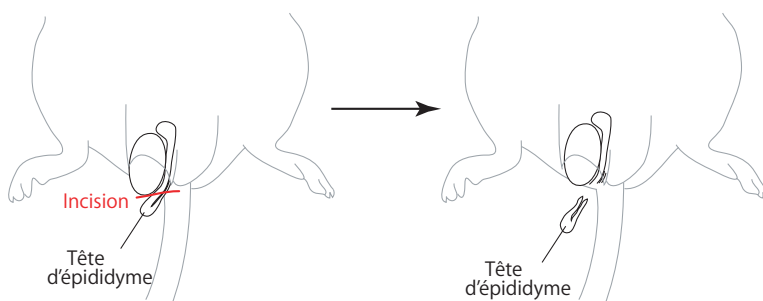
Procédure

Collection des têtes d'épididymes

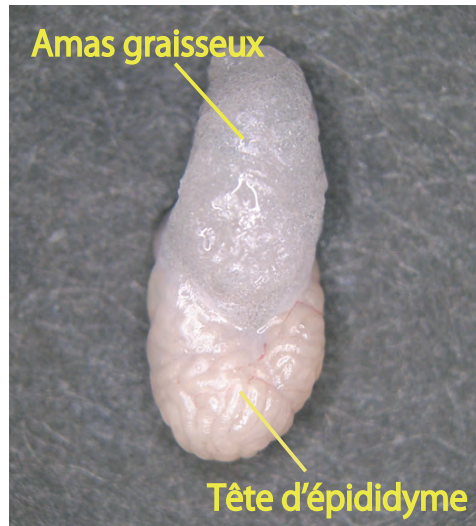
1. Anesthésier la souris male.
2. Faire une petite incision au niveau du scrotum pour faire sortir la tête d'épididyme.



3. Couper le canal déférent et le corps de l'épididyme, puis collecter la tête d'épididyme.



[Collecte de tête d'épididyme]



[Collection de la tête d'épididyme sur un male anesthésié] No. 03-01

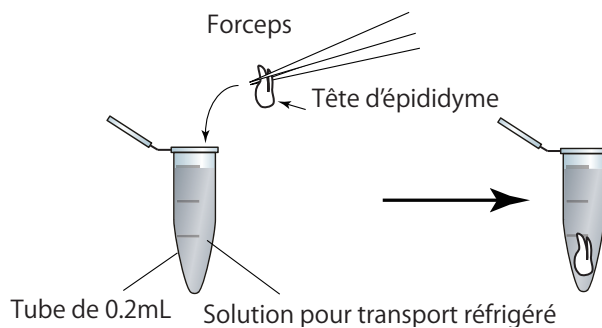


4. Replacer les testicules dans l'abdomen et suturer à l'aide de clips.
5. Maintenir la souris sur la plaque chauffante à 37°C jusqu'à ce que l'effet des anesthésiants ait complètement disparu.

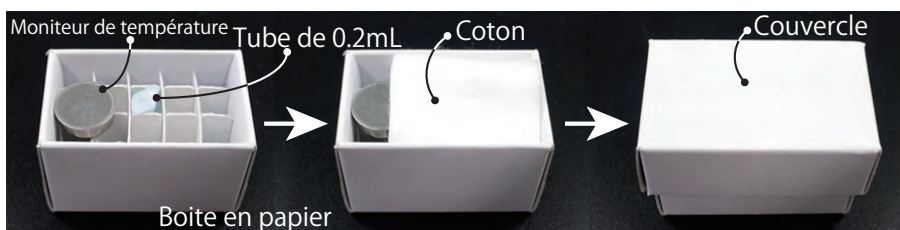
Emballage et transport des têtes d'épididymes

Le matériel utilisé pour emballer les têtes d'épididymes doit être maintenu à 4-8 °C jusqu'à utilisation. De plus, la procédure d'emballage doit être effectuée le plus rapidement possible pour éviter le réchauffement des têtes d'épididymes.

1. Transférez les têtes d'épididymes dans le tube de 0.2mL contenant la solution de transport.

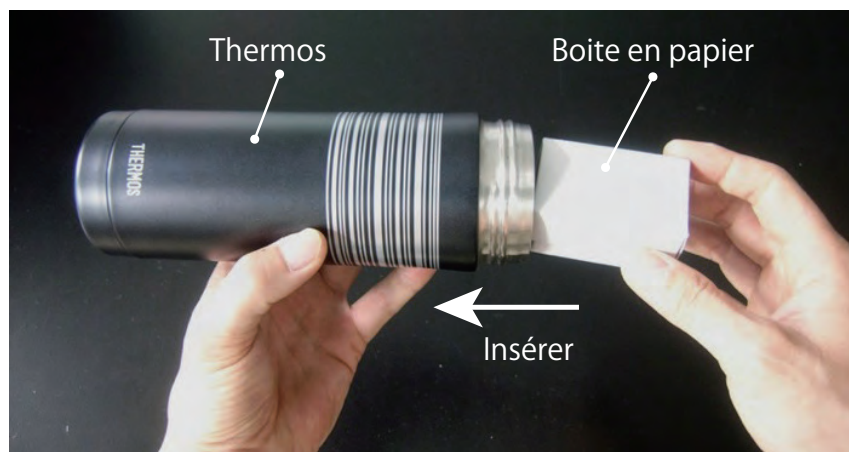


2. Placez le tube contenant les têtes d'épididymes, le moniteur de température, et le morceau de coton dans la boîte en papier.

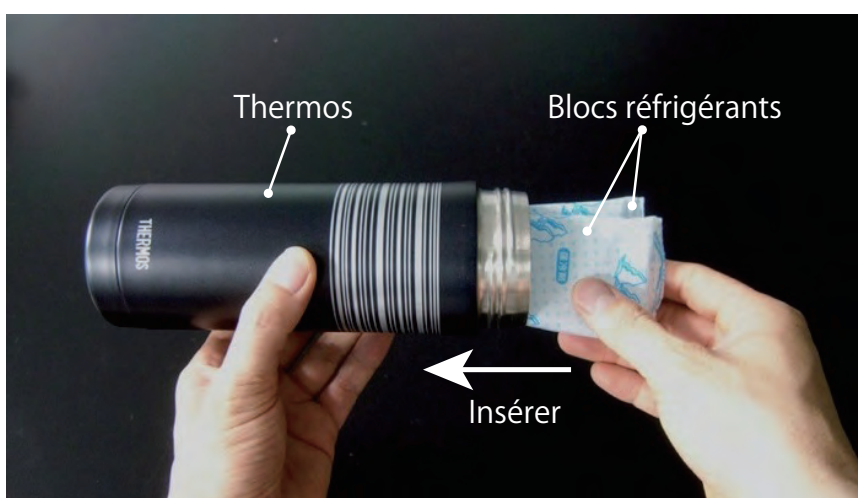
**Remarque**

Une semaine après l'opération chirurgicale le male peut être à nouveau accouplé.

3. Placez la boîte en papier dans le thermos.



4. Placer deux petits blocs réfrigérants dans le thermos.



5. Visser le couvercle du thermos.



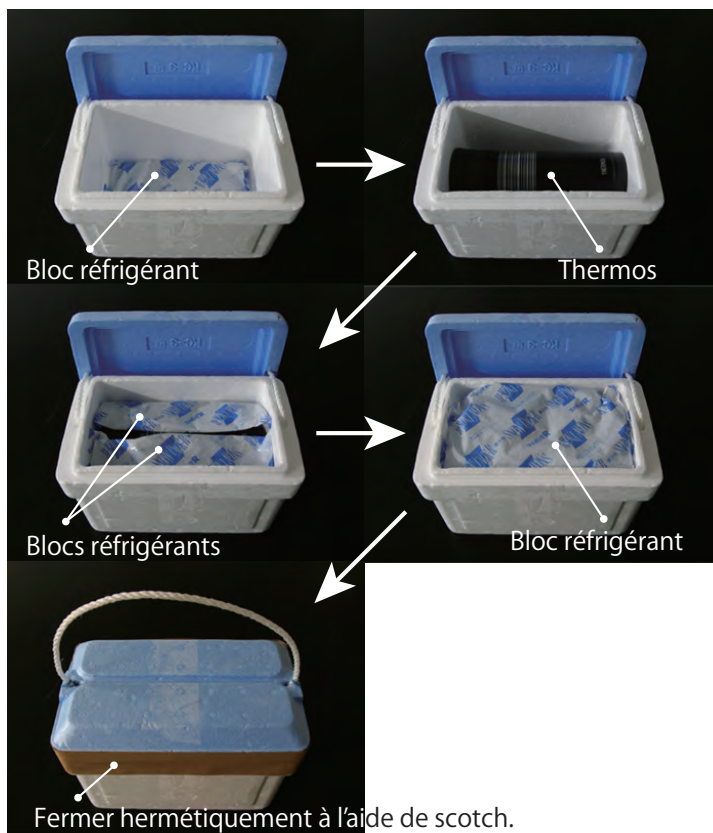
6. Mettre un grand bloc réfrigérant au fond du conteneur en polystyrène et placer le thermos par dessus.
 7. Ajouter un grand bloc réfrigérant de chaque côté du thermos, et un dernier par dessus.
 8. Mettre le couvercle du conteneur en place et attacher le avec du scotch.

Note

Prenez soin de ne pas placer la boîte en papier à l'envers.

Note

Il n'est pas possible de mettre le thermos au fond du conteneur car la taille du thermos est la même que celle du conteneur. Le thermos doit donc être placé au centre du conteneur en polystyrène, ce qui assure une plus grande protection durant le transport.



9. Maintenir le conteneur réfrigéré jusqu'à arrivée du transporteur.
10. Envoyer le conteneur par service postal.

Références

1. Takeo T., Tsutsumi A., Omaru T., Fukumoto K., Haruguchi Y., Kondo T., Nakamuta Y., Takeshita Y., Matsunaga H., Tsuchiyama S., Sakoh K., Nakao S., Yoshimoto H., Shimizu N., and Nakagata N. 2012. Establishment of a transport system for mouse epididymal sperm at refrigerated temperatures. *Cryobiology*. 65(3): 163-168.

Note

Le conteneur doit être maintenu réfrigéré durant le transport. Assurez-vous des conditions de transport auprès du service postal.

Remarque

Les capacités de fertilisation du sperme épидидymaire réfrigéré restent maximales jusqu'à 72 heures.

2-2 Fécondation *In Vitro* avec sperme épидидymaire transporté à basse température

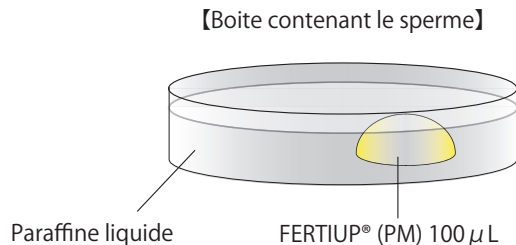
Matériel et Equipement

1. Queues d'épididymes transportées à basse température
2. FERTIUP® (Milieu de Préincubation: PM, Cat. No. KYD-002-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
3. mHTF (Fluide tubal humain modifié)
4. Paraffine liquide
5. Micropipettes
6. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
7. Ciseaux de précision
8. Une paire de forceps watchmaker's #5
9. Papier filtre
10. Etuve humidifiée (37°C , 5% CO₂)

Procédure

Collection des queues d'épididymes

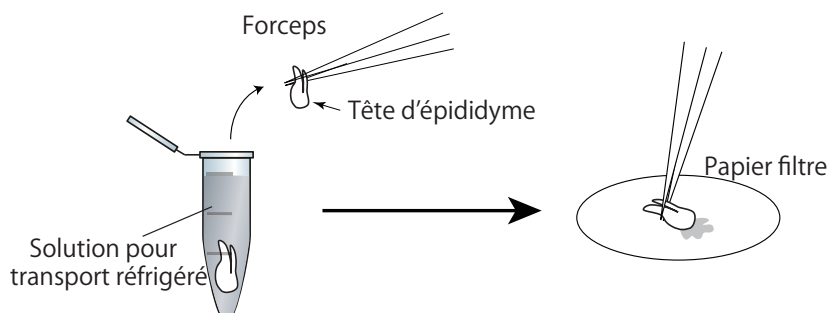
1. Pipetez une goutte (100 µL / goutte) de FERTIUP®(PM) dans une boîte de Pétri and recouvrez-la avec de la paraffine liquide 30 minutes avant de collecter le sperme épидидymaire transporté à basse température, et placer la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO₂)



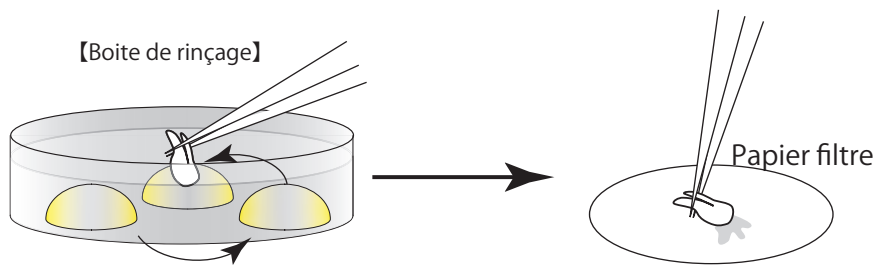
2. Retirez le tube de 0.2mL du conteneur de transport en polystyrène.

[Collecter les queues d'épididymes] No. 04-01 

3. Ouvrez le tube, collectez les queues d'épididymes et placez-les sur un papier filtre rapidement pour égoutter la solution de transport.



4. Rincez les queues d'épididymes dans chacune des trois gouttes de mHTF de la boîte de rinçage. Après rinçage, égouttez l'excès de mHTF sur le papier filtre.



5. Placez les queues d'épididymes dans la boîte de Pétri contenant le sperme. Les spermatozoïdes épididymaires transportés à basse température peuvent être utilisés pour la fécondation *in vitro* de la même manière que le sperme fraîchement prélevé. Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 6.

Références

1. Takeo T., Tsutsumi A., Omaru T., Fukumoto K., Haruguchi Y., Kondo T., Nakamuta Y., Takeshita Y., Matsunaga H., Tsuchiyama S., Sakoh K., Nakao S., Yoshimoto H., Shimizu N., and Nakagata N. 2012. Establishment of a transport system for mouse epididymal sperm at refrigerated temperatures. *Cryobiology*. 65(3): 163-168.

Remarque

Préparer les boîtes de rinçage juste avant leur utilisation en disposant 3 gouttes de mHTF (100µL / goutte) dans une boîte de Pétri sans recouvrir de paraffine liquide.

Note

Si le sperme ne sort que difficilement, procédez à une incision supplémentaire dans les queues d'épididymes pour libérer plus de sperme.

Note

Il y a trois méthodes différentes pour préparer le CARD MEDIUM®, selon que la fécondation *in vitro* est faite à partir de sperme frais, congelé, ou réfrigéré. Reportez-vous au manuel d'instruction du CARD MEDIUM® pour plus de détails.

3-1 Cryopréservation de spermatozoïdes murins

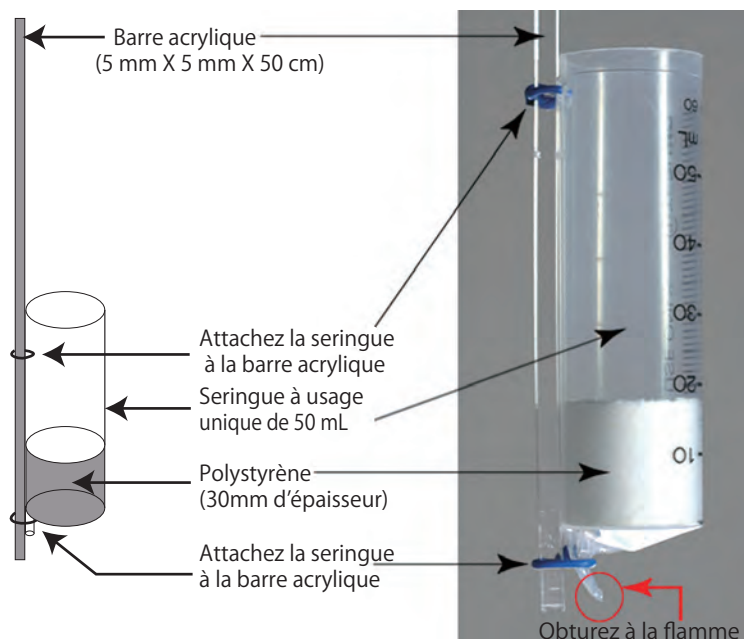
Matériel and Equipement

1. Souris male (âgée de 12 semaines)
2. Ciseaux à micro-ressorts (lame de 5 mm)
3. Une paire de forceps watchmaker's #5
4. FERTIUP® (Agent CryoProtecteur: ACP, Cat. No. KYD-001-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
5. mHTF (Fluide tubal humain modifié)
6. Paraffine liquide
7. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
8. Embouts pour pipettes
9. Paillettes pour sperme (10 Pièces x 10 lots, EOG stérilisées, Cat. No. KYD-S020X10, Cosmo Bio Co., Ltd.)
10. Micropipettes
11. Connecteur de paillettes (Cat. No. KYD-S025, Cosmo Bio Co., Ltd.)
12. Scelleuse thermique à impulsions
13. Gobelet pour la congélation (Cat. No. KYD-S018, Cosmo Bio Co., Ltd.)
14. Cassette triangulaire (10 unités, Cat. No. KYD-S021 or KYD-S035, Cosmo Bio Co., Ltd.)
15. Cuve ou conteneur à azote liquide
16. Plaque chauffante (37°C)

Procédure

Préparation du gobelet pour la congélation

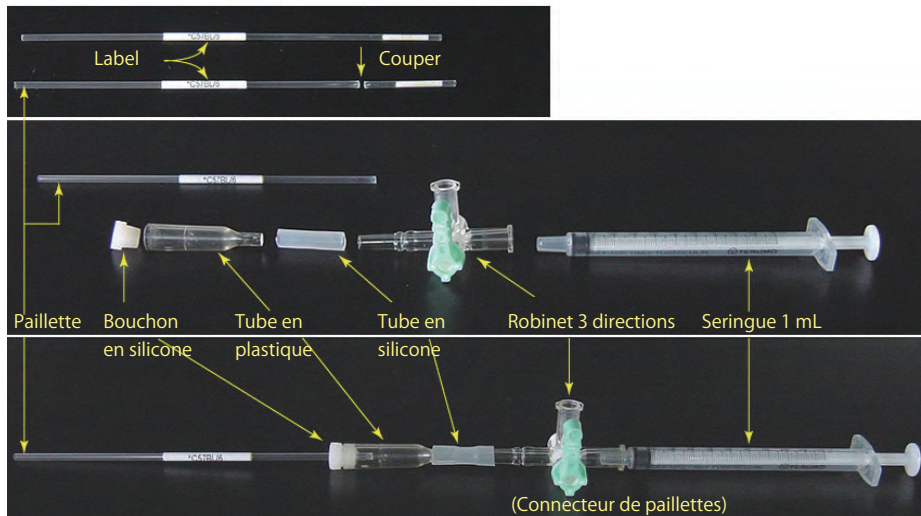
1. Insérer fermement un morceau de polystyrène au fond de la seringue.
2. Obturez le bout de la seringue en le faisant fondre dans une flamme.
3. Attachez la seringue à une barre en acrylique.



Préparation du connecteur de paillettes

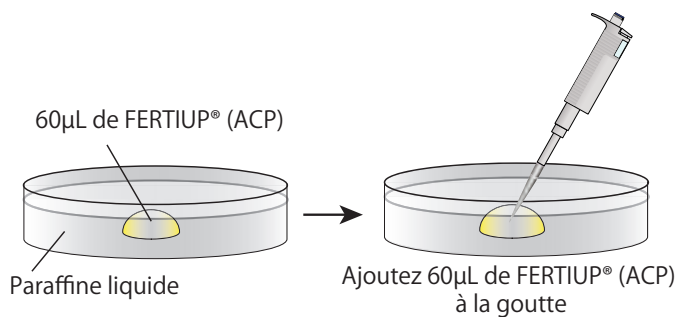
1. Assemblez une seringue 1 mL, un robinet 3 directions, un tube en silicone, un embout en plastique, et un bouchon de silicone comme indiqué sur le schéma ci-dessous.
2. Pour utiliser le connecteur de paillettes, il suffit de couper la paillette pour se débarrasser du bouchon en coton, puis enfiler la paillette dans le bouchon de silicone.

1. [Assemblage du connecteur de paillettes]

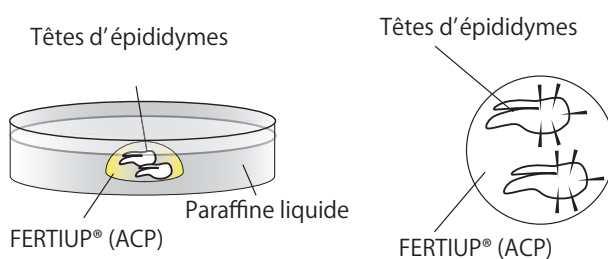


Préparation de la suspension de sperme

1. Pipeter une goutte de 60 μ L de FERTIUP® (ACP) sur une boîte de Pétri de 35 mm et recouvrez-la de paraffine liquide.
2. Ajouter 60 μ L de la même solution à la première goutte (volume final: 120 μ L) pour créer une goutte semi-sphérique et minimiser le diamètre de la base. Placer la boîte sur une plaque chauffante à 37°C jusqu'à utilisation.



3. Sacrifiez un male (>12 semaines) par dislocation cervicale et disséquez les deux têtes d'épididymes de manière aseptique.
4. Placez les têtes d'épididymes sur le papier filtre pour égoutter au microscope le sang et la graisse.
5. Transférez les têtes d'épididymes dans une goutte de FERTIUP® (ACP) et faites 5 à 6 incisions dans les épидидymes à l'aide des forceps watchmaker's #5 et des ciseaux à micro-ressorts.

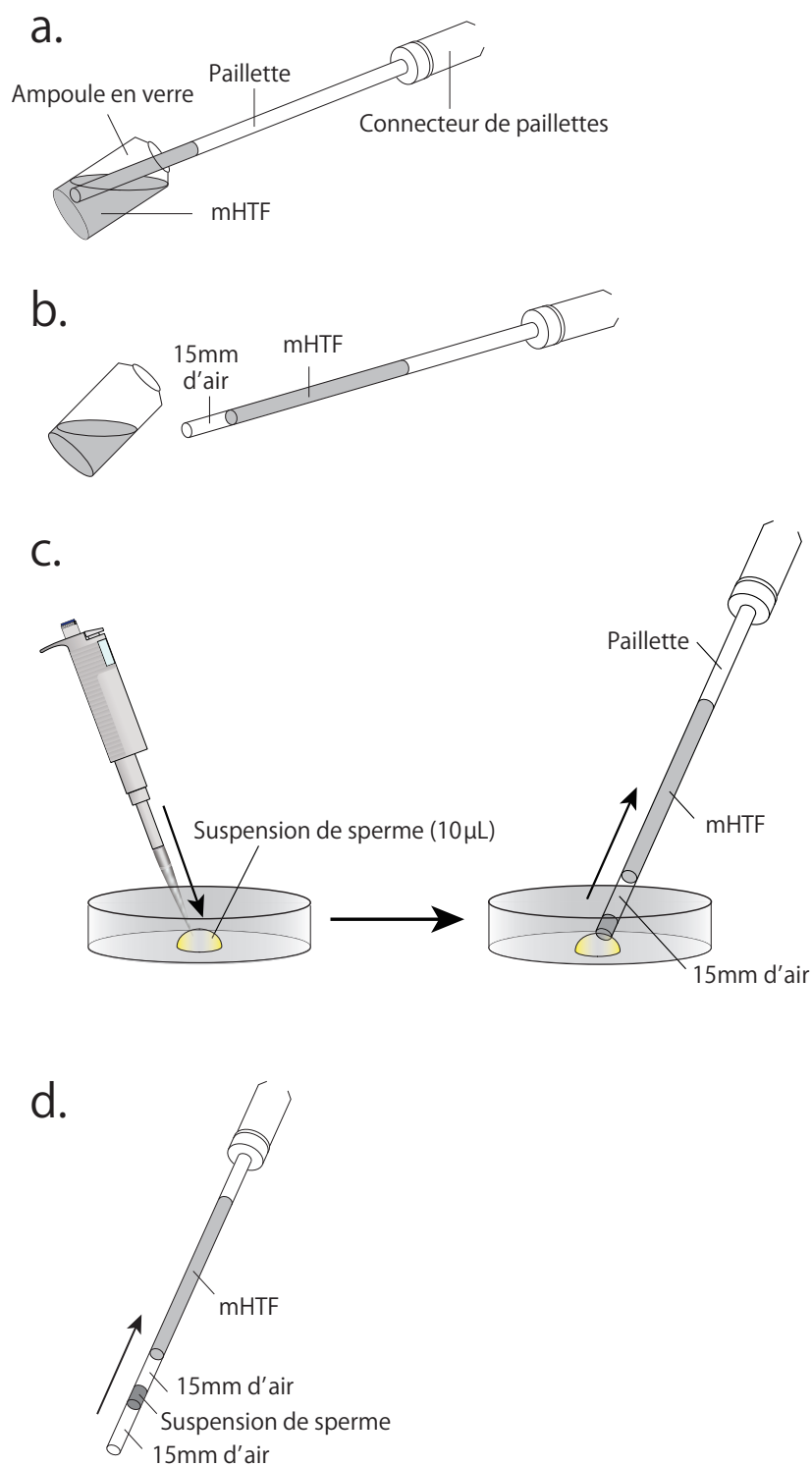


6. Placer la boîte sur la plaque chauffante à 37°C pendant 3 minutes et faites faire de petites rotations à la boîte pour disperser le sperme dans le FERTIUP® (ACP) chaque minute.

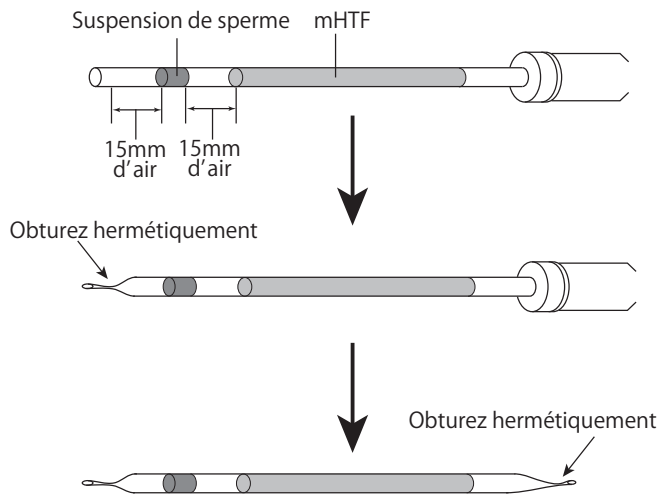
[Dissection des têtes d'épididymes et préparation de la suspension de sperme] No. 05-01 

Préparer les paillettes contenant le sperme en suspension

1. Attachez une paillette au connecteur.
2. Aspirer délicatement dans la paillette et dans l'ordre suivant:
 - a. 100 μ L de mHTF,
 - b. 15mm d'air,
 - c. 10 μ L de sperme en suspension,
 - d. 15 mm d'air.



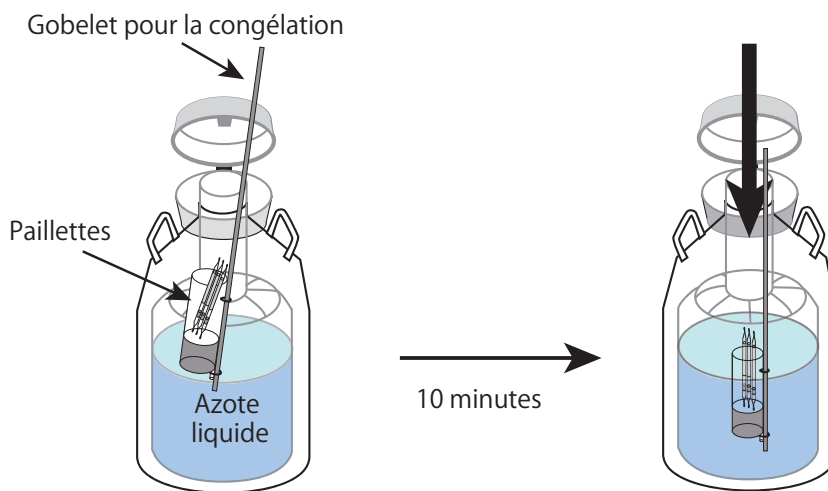
3. Scellez les deux côtés de la paillette avec la scelleuse à impulsions.



4. Répétez la procédure pour collecter 10 échantillons par souris de la même manière.

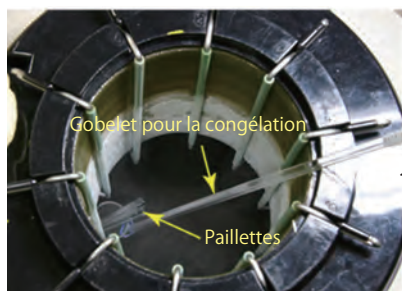
Congélation de sperme dans une cuve cryobiologique

1. Placez les paillettes dans un gobelet pour congélation, et laissez-le flotter dans le conteneur cryobiologique.
2. Au bout de 10 minutes, immergez rapidement le gobelet dans l'azote liquide.



[Gobelet flottant sur l'azote liquide]

[Gobelet immergé dans l'azote liquide]



10 minutes



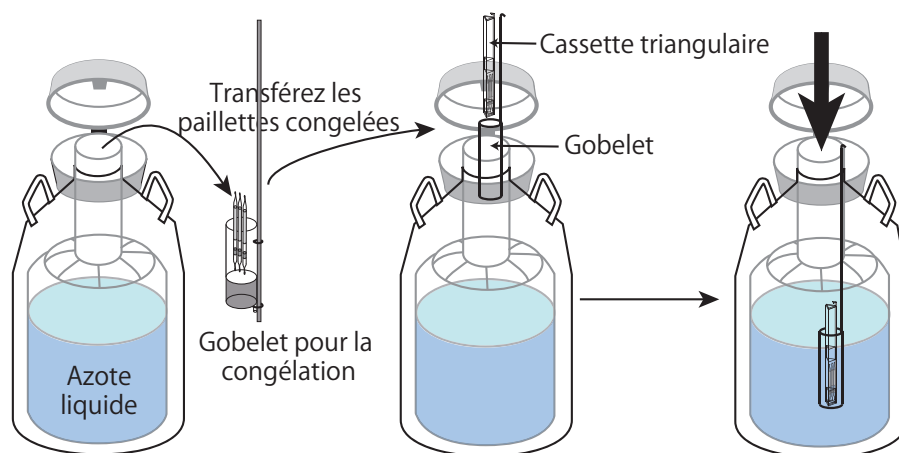
[Congélation des paillettes] No. 05-02



Remarque

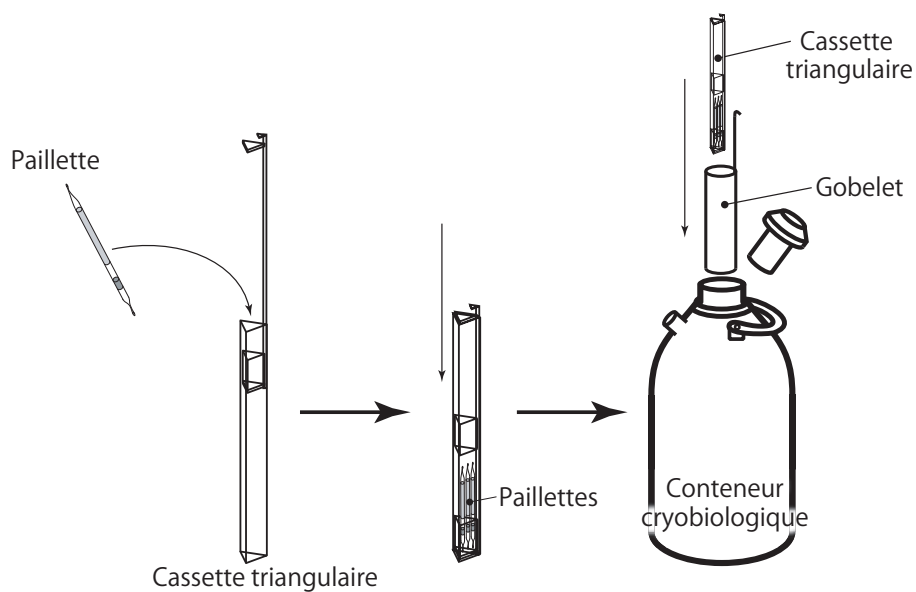
Le mHTF est ajouté dans la paillette pour éviter que celle-ci flotte à la surface de l'azote liquide car le mHTF augmente le poids de la paillette, lui permettant de couler.

- Retirez le gobelet de l'azote liquide et transférez les paillettes dans une cassette triangulaire pour un stockage à long terme dans une cuve à azote liquide.



Congélation de sperme dans un conteneur cryobiologique

- Transférez les paillettes dans une cassette triangulaire.
- Placez la cassette triangulaire dans un gobelet pré-frigorifié.
- Placez le gobelet dans le conteneur à azote liquide pendant 10 minutes.



Remarque

La congélation de sperme dans un conteneur cryobiologique peut être utilisée à des fins de transport du sperme.

Références

1. Nakagata N., and Takeshima T. 1992. High fertilizing ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. *Theriogenol.* **37**: 1283-1291.
2. Nakagata N., Ueda S., Yamanouchi K., Okamoto K., Matsuda Y., Tsuchiya T., Nishimura M., Oda S., Koyasu K., Azuma S., and Toyoda Y. 1995. Cryopreservation of wild mouse spermatozoa. *Theriogenol.* **43**: 635-643.
3. Nakagata N. 1996. Use of cryopreservation techniques of embryos and spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice and for maintenance of Tg mouse lines. *Lab. Anim. Sci.* **46**: 236-238.
4. Okamoto M., Nakagata N., Ueda O., Kamada N., and Suzuki H. 1998. Cryopreservation of gene disrupted mouse spermatozoa. *J. Mamm. Ova. Res.* **15**: 77-80.
5. Takeo T., Hoshii T., Kondo Y., Toyodome H., Arima H., Yamamura KI., Irie T., and Nakagata N. 2008. Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. *Biol Reprod.* **78**(3): 546-551.
6. Nakagawa Y., Fukumoto K., Kondo T., Koga M., Takeshita Y., Nakamuta Y., Sakaguchi M., Haruguchi Y., Tsuchiyama S., Kaneko T., and Nakagata N. 2009. Fertilization ability of C57BL/6J mouse spermatozoa frozen in a dry shipper. *Exp. Anim.* **58**(3) Suppl: 297.
7. Takeo T., and Nakagata N. 2010. Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Lab. Anim.* **44**(2): 132-137.
8. Nakagata N. 2011. Cryopreservation of mouse spermatozoa and *in vitro* fertilization. *Methods Mol Biol.* **693**: 57-73.
9. Takeo T., Nakagata N. 2011. Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL /6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin. *Biol Reprod.* **85**(5): 1066-1072.

3-2 Fécondation *In Vitro* avec spermatozoïdes congelés

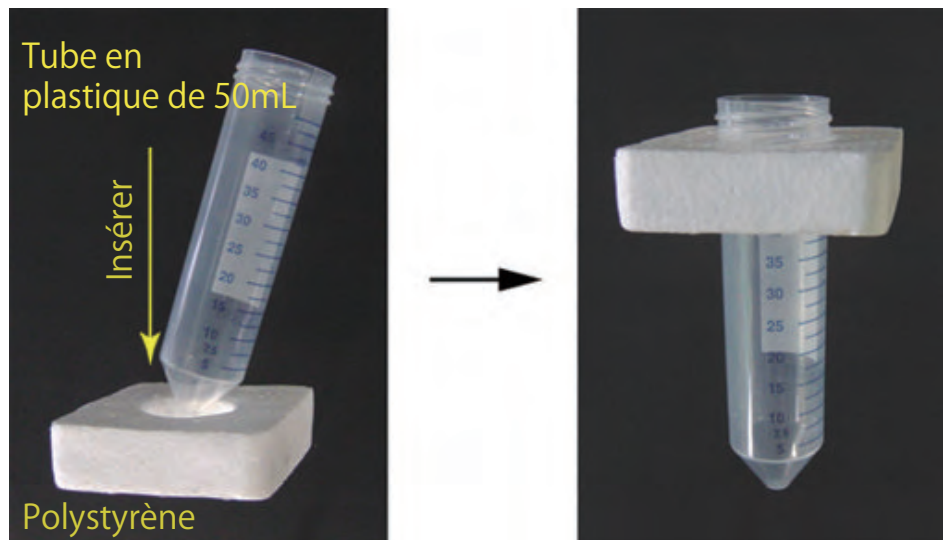
Matériel and Equipement

1. Souris femelle superovulée avec PMSG et hCG
2. FERTIUP® (Milieu de Préincubation: PM, Cat. No. KYD-002-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
3. CARD MEDIUM® (Cat. No. KYD-003-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
4. mHTF (Fluide tubal humain modifié)
5. Paraffine liquide
6. Embouts pour pipette (Cat. No. 3520; Thermo SCIENTIFIC)
7. Boîtes de Pétri en plastique (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
8. Connecteur de paillettes (Cat. No. KYD-S025, Cosmo Bio Co., Ltd.) (Se référer au chapitre Congélation de spermatozoïdes murins en page 21)
9. Bain-marie maintenu à 37°C
10. Morceau de polystyrène pour la décongélation
11. Micropipettes
12. Etuve humidifiée (37°C, 5% CO₂)

Procédure

Préparation du polystyrène pour la décongélation

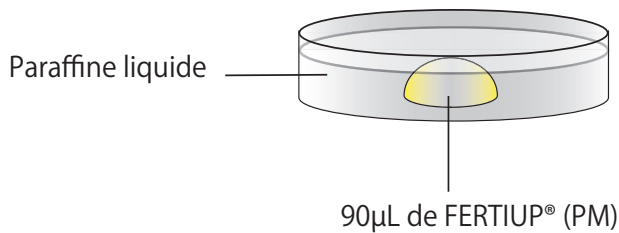
1. Découpez un morceau de polystyrène capable de faire flotter un tube de 50 mL, comme indiqué sur le schéma ci-dessous.



Préparation pour la décongélation

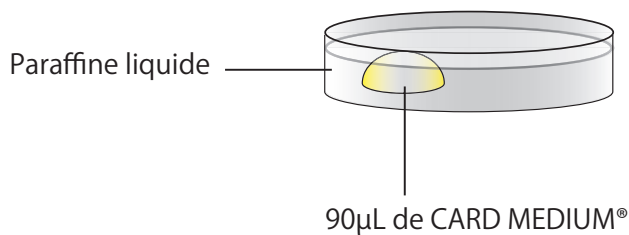
1. Maintenez le bain-marie à 37°C .
2. Versez de l'eau (37°C) dans le tube de 50 mL puis insérez-le dans le morceau de polystyrène avant de laissez flotter le tout dans le bain-marie.
3. Mettre une goutte (90 µL / goutte) de FERTIUP® (PM) dans une boîte de Pétri et recouvrez-la de paraffine liquide 30 minutes avant de commencer la décongélation. Placez la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂).

【Boîte de Pétri contenant le sperme】



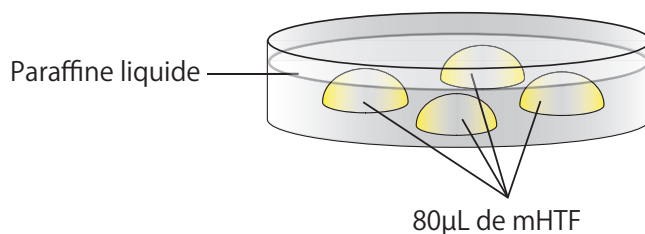
4. Mettre une goutte (90 µL / goutte) de CARD MEDIUM® dans une boîte de Pétri et recouvrez-la de paraffine liquide 10 minutes avant de collecter les ovocytes. Placez la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂).

【Boîte de fécondation】



5. Mettre quatre gouttes (80 µL / goutte) de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrez-les de paraffine liquide. Placez la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) au minimum 30 minutes.

【Boîte de rinçage】

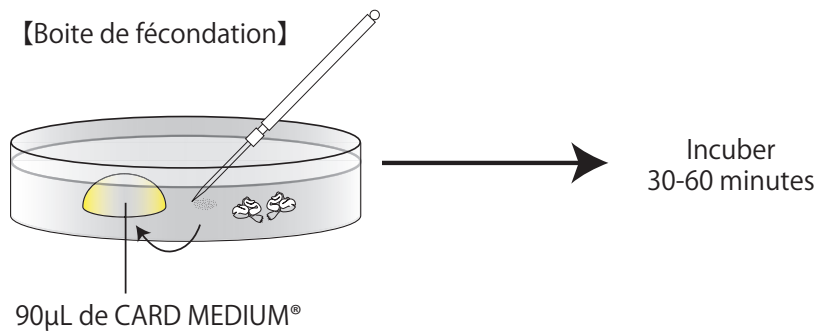


Note

Il y a trois méthodes différentes pour préparer le CARD MEDIUM®, selon que la fécondation *in vitro* est faite à partir de sperme frais, congelé, ou réfrigéré. Reportez-vous au manuel d'instruction du CARD MEDIUM® pour plus de détails.

Collection des Ovocytes

1. Sacrifiez une femelle 15-17 heures après injection d'hCG et disséquer les oviductes. (Se référer au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 9)
2. Collectez les complexes cumulus-ovocytes (CCOs) à l'aide d'aiguilles de dissection pointues et placez 4-6 CCOs par goutte de CARD MEDIUM® (90 µL) (Boîte de Fécondation).
3. Maintenez la boîte de fécondation avec les CCOs dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) pendant 30-60 minutes avant insémination.



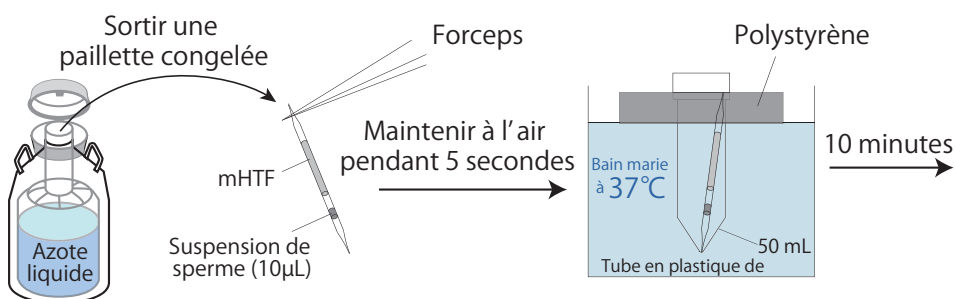
Note

Assurez-vous d'effectuer toutes les opérations, depuis l'abatage des femelles et la collecte des oviductes jusqu'à l'immersion des CCOs dans la goutte de CARD MEDIUM® en un minimum de temps (30 secondes maximum).

Si vous effectuez la procédure sans assistance, assurez-vous de ne pas sacrifier plusieurs souris à la fois. Il est préférable de n'abattre qu'une souris et prélever ses oviductes rapidement avant de procéder à la dissection de la souris suivante.

Décongélation de spermatozoïdes murins

1. Sortez une paille de l'azote liquide et maintenez-la à l'air ambiant pendant 5 secondes.
2. Placez immédiatement la paille dans le tube de 50 mL flottant dans le bain-marie à 37°C pendant 10 minutes.
3. Dix minutes après immersion, retirez la paille du bain-marie.
4. Essayez la paille avec du papier filtre.



Note

Assurez-vous d'immerger complètement la partie de la paille contenant le sperme lors de la décongélation dans le bain-marie.

Les spermatozoïdes ayant été congelés puis réanimés sont particulièrement sensibles aux changements environnementaux.

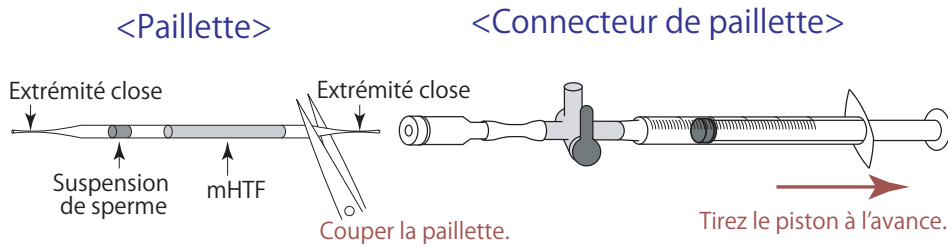
Si la paille n'est pas maintenue dans le bain-marie assez longtemps (10 minutes) la motilité des spermatozoïdes décongelés sera réduite.

[Décongélation de Spermatozoïdes murins] No. 06-01

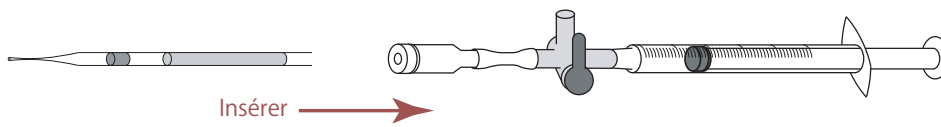


Transfert et préincubation de la suspension de sperme décongelée

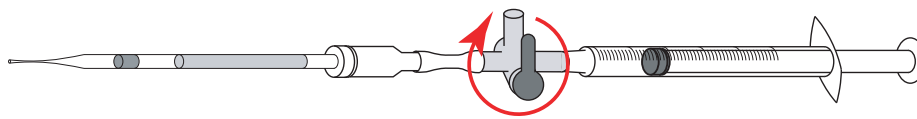
1. Tirez légèrement le piston hors de la seringue du connecteur de paillettes, et coupez la paillette aux ciseaux entre le mHTF et l'extrémité de la paillette.



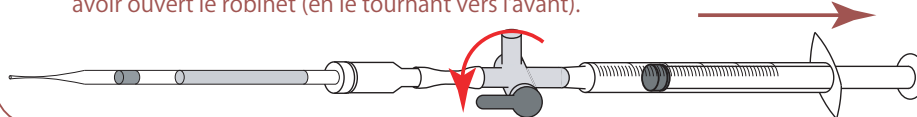
2. Insérez la paillette dans le connecteur.



3. Ouvrir le robinet afin de relâcher la pression créée par l'insertion de la paillette dans le connecteur.

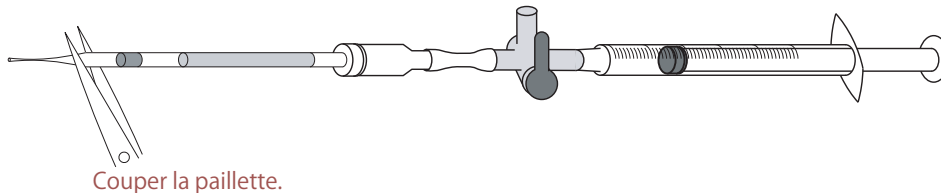


Si vous avez omis de tirer le piston à l'avance, vous pouvez le faire après avoir ouvert le robinet (en le tournant vers l'avant).

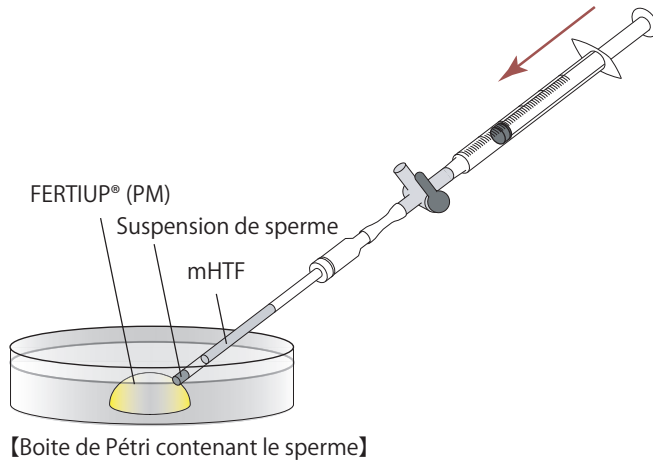


4. Refermez le robinet et coupez la paillette entre l'extrémité et la suspension de sperme.

Refermez le robinet en le mettant en position verticale.



5. Poussez le piston avec précaution afin de ne transférer que la suspension de sperme dans la goutte de FERTIUP®(PM) (boîte de Pétri contenant le sperme), puis placez la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) pendant 30 minutes.



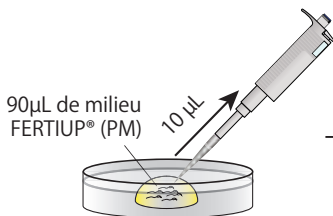
[Transfert de paillettes contenant le sperme décongelé] No. 06-02



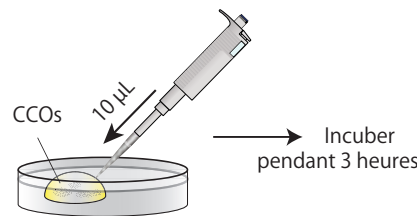
Insémination

1. Pipetez 10 µL de sperme préincubé à la périphérie de la goutte au moyen d'un embout de pipette conique (Cat. No. 3520; Thermo SCIENTIFIC).
2. Ajoutez 10 µL de sperme à chaque goutte de CARD MEDIUM® contenant les CCOs.
3. Incubez les ovocytes et spermatozoïdes pendant 3 heures dans une étuve (37°C, 5% CO₂).

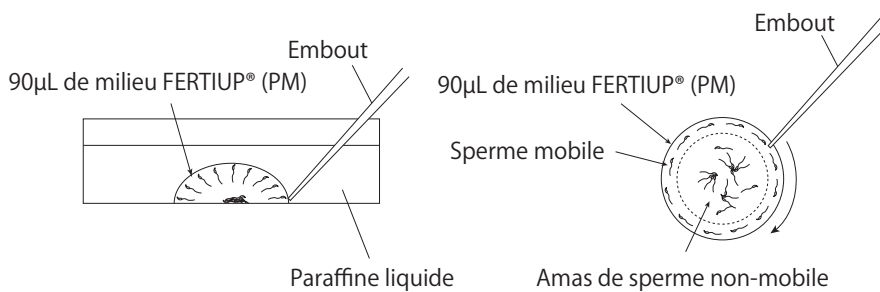
【Boîte de Pétri contenant le sperme】



【Boîte de fécondation】



[Pipetage du Sperm en Suspension depuis la périphérie de la goutte]



[Aspiration de la Suspension de Sperm Préincubé et Insémination des Ovocytes]

No. 06-03

4. Après incubation, rincez les ovocytes 3 fois dans du mHTF frais dans une boîte de rinçage, en évitant de transférer du CARD MEDIUM®.

Note

Assurez-vous de ne pas manipuler les boîtes de Pétri contenant les spermatozoïdes décongelés avant qu'ils ne soient suffisamment mobiles dans le milieu. En cas de manipulation excessive des boîtes de Pétri avant que les spermatozoïdes commencent à bouger, ceux-ci ne récupéreront pas totalement leur motilité.

Remarque

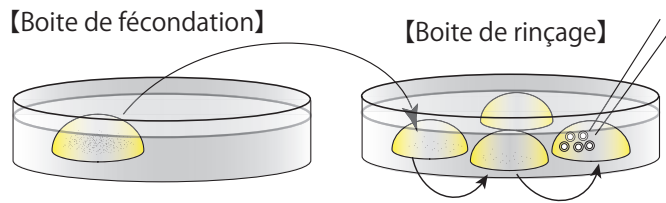
Les spermatozoïdes à haute motilité ont tendance à se regrouper à la périphérie de la goutte.

Remarque

Il est possible de pipeter 10 µL de la suspension de sperme jusqu'à 3-4 fois depuis la même goutte.

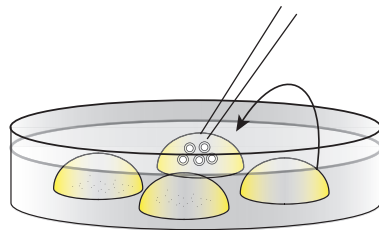
Note

Effectuez le pipetage des étapes 1 et 2 avec le plus de précaution possible.



5. Six heures après insémination, observez les ovocytes dans la troisième goutte de mHTF et éliminez les ovocytes parthénogénétiques n'ayant qu'un seul pronucléus. (Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 11)
6. Après une nuit de culture, transférez uniquement les embryons ayant atteint le stade 2 cellules dans la 4ème goutte de mHTF de la boîte de rinçage. Ces embryons peuvent être vitrifiés ou réimplantés. (Reportez-vous aux chapitres Vitrification rapide d'embryons murins en page 54 et Transfert d'embryons dans l'oviducte en page 66).

【Boite de rinçage】



Références

1. Nakagata N., and Takeshima T. 1992. High fertilizing ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. *Theriogenol.* **37**: 1283-1291.
2. Nakagata N., Ueda S., Yamanouchi K., Okamoto K., Matsuda Y., Tsuchiya T., Nishimura M., Oda S., Koyasu K., Azuma S., and Toyoda Y. 1995. Cryopreservation of wild mouse spermatozoa. *Theriogenol.* **43**: 635-643.
3. Nakagata N. 1996. Use of cryopreservation techniques of embryos and spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice and for maintenance of Tg mouse lines. *Lab. Anim. Sci.* **46**: 236-238.
4. Okamoto M., Nakagata N., Ueda O., Kamada N., and Suzuki H. 1998. Cryopreservation of gene disrupted mouse spermatozoa. *J. Mamm. Ova. Res.* **15**: 77-80.
5. Takeo T., Hoshii T., Kondo Y., Toyodome H., Arima H., Yamamura KI., Irie T., and Nakagata N. 2008. Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. *Biol. Reprod.* **78**(3): 546-551.
6. Nakagawa Y., Fukumoto K., Kondo T., Koga M., Takeshita Y., Nakamura Y., Sakaguchi M., Haruguchi Y., Tsuchiyama S., Kaneko T., and Nakagata N. 2009. Fertilization ability of C57BL/6J mouse spermatozoa frozen in a dry shipper. *Exp. Anim.* **58**(3) Suppl: 297.
7. Takeo T., and Nakagata N. 2010. Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Lab. Anim.* **44**(2): 132-137.
8. Nakagata N. 2011. Cryopreservation of mouse spermatozoa and *in vitro* fertilization. *Methods Mol Biol.* **693**: 57-73.
9. Takeo T., Nakagata N. 2011. Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin. *Biol. Reprod.* **85**(5): 1066-1072.

3-3 Méthode de ressuscitation de lignées par fécondation *In Vitro* avec spermatozoïdes congelés

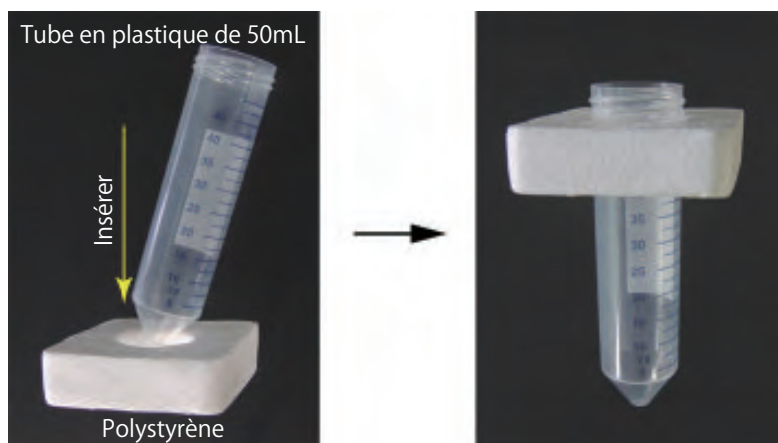
Matériel and Equipement

1. Stock de spermatozoïdes congelés
2. Souris femelle superovulée avec PMSG et hCG
3. FERTIUP® (Milieu de Préincubation: PM, Cat. No. KYD-002-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
4. CARD MEDIUM® (Cat. No. KYD-003-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
5. mHTF (Fluide tubal humain modifié)
6. Paraffine liquide
7. Bain-marie maintenu à 37°C
8. Morceau de polystyrène pour la décongélation
9. Tube de 1.5mL (Quality Scientific Plastics 1.5ml Graduated Microcentrifuge Tube avec Flat Top Cap, Natural Cat. No. 509-GRD-Q)
10. Centrifugeuse
11. Micropipettes
12. Boîtes de Pétri en plastique (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
13. Etuve humidifiée (37°C , 5% CO₂)

Procédure

Préparation du polystyrène pour la décongélation

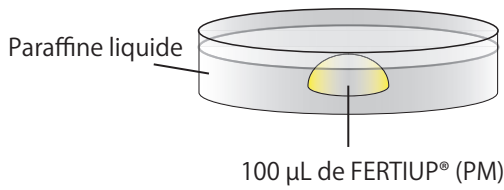
1. Découpez un morceau de polystyrène capable de faire flotter un tube de 50 mL, comme indiqué sur le schéma ci-dessous.



Préparation pour la décongélation

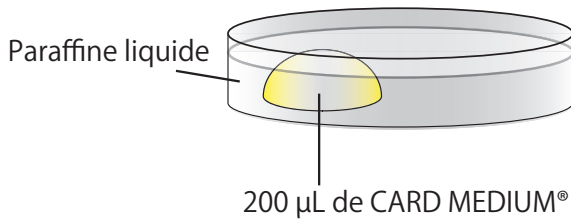
1. Maintenez le bain-marie à 37°C .
2. Versez de l'eau (37°C) dans le tube de 50 mL puis insérez-le dans le morceau de polystyrène avant de laisser flotter le tout dans le bain-marie.
3. Mettre une goutte (100 µL / goutte) de FERTIUP®(PM) dans une boîte de Pétri et recouvrez-la de paraffine liquide 30 minutes avant de commencer la décongélation. Placez la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C ,5% CO₂ in air).

【Boite de Pétri contenant le sperme】



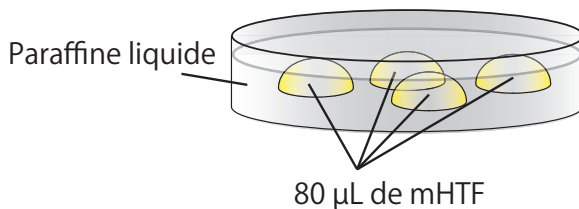
- Mettre une goutte (200 µL / goutte) de CARD MEDIUM® dans une boite de Pétri et recouvrez-la de paraffine liquide 10 minutes avant de collecter les ovocytes. Placez la boite de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂ in air).

【Boite de Pétri contenant les ovocytes】



- Mettre quatre gouttes (80 µL / drop) de mHTF dans une boite de Pétri et recouvrez-les de paraffine liquide. Placez la boite de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂ in air) au minimum 30 minutes.

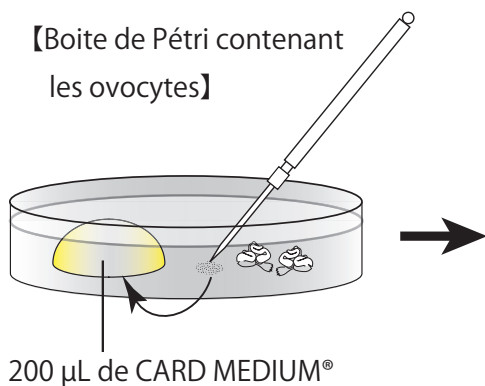
【Boite de rinçage】



Collection et préincubation des Ovocytes

- Sacrifiez une femelle 15-17 heures après injection d'hCG et disséquer les oviductes. (Se référer au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 9)
- Collectez les complexes cumulus-ovocytes (CCOs) à l'aide d'aiguilles de dissection pointues et placez 6-20 CCOs par goutte de CARD MEDIUM® (200 µL) (boite contenant les ovocytes). Préincubez pendant 60 minutes dans l'étuve.

【Boite de Pétri contenant les ovocytes】



Préincuber pendant 60 minutes

Note

Il y a trois méthodes différentes pour préparer le CARD MEDIUM®, selon que la fécondation *in vitro* est faite à partir de sperme frais, congelé, ou réfrigéré. Reportez-vous au manuel d'instruction du CARD MEDIUM® pour plus de détails.

Note

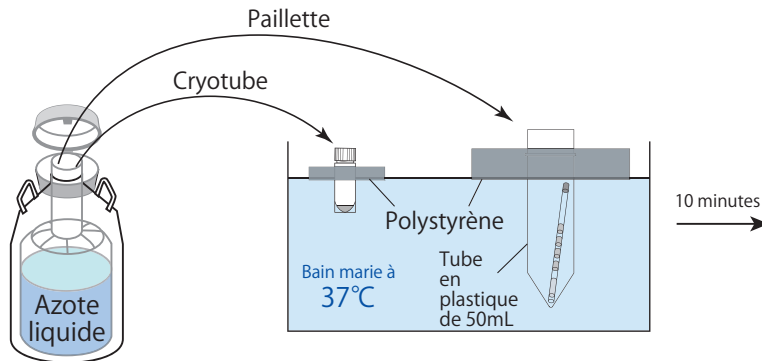
Assurez-vous d'effectuer toutes les opérations, depuis l'abatage des femelles et la collecte des oviductes jusqu'à l'immersion des CCOs dans la goutte de CARD MEDIUM® en un minimum de temps (30 secondes maximum).

Si vous effectuez la procédure sans assistance, assurez-vous de ne pas sacrifier plusieurs souris à la fois. Il est préférable de n'abattre qu'une souris et prélever ses oviductes rapidement avant de procéder à la dissection de la souris suivante.

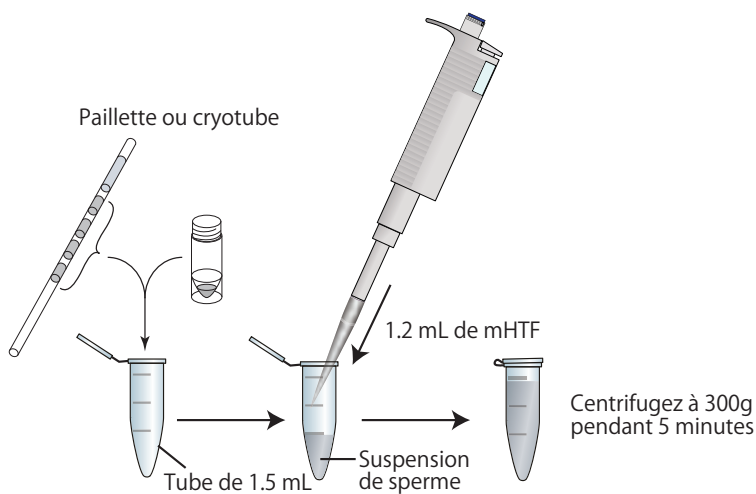
Décongélation de spermatozoïdes murins

- Sortez une paillette de l'azote liquide.

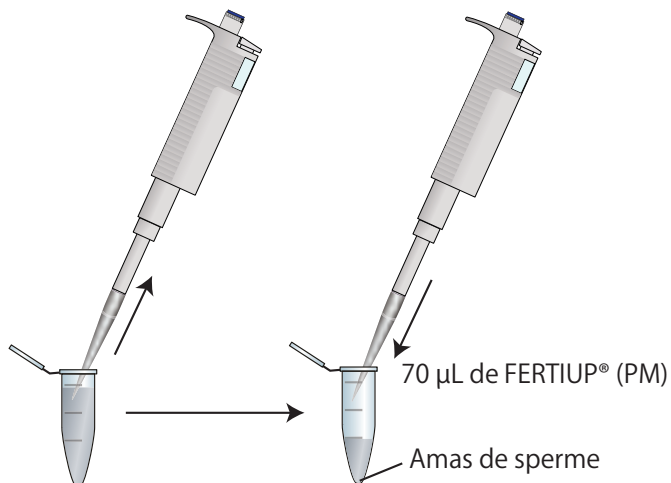
Si le sperme est conservé dans un cryotube, ouvrir le bouchon et vider l'azote liquide hors du tube. Immerger le cryotube dans un bain-marie à 37°C (en utilisant le tube de 50mL et le morceau de polystyrène).



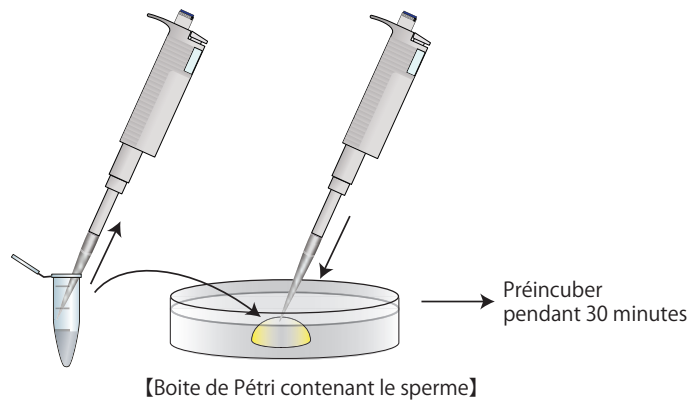
- Transférez la suspension de sperme du cryotube ou de la paillette dans un tube de 1.5mL. Ajouter avec précaution 1.2mL de mHTF maintenu à 37°C, et centrifugez à 300g a température ambiante pendant 5 minutes.



- Après centrifugation, éliminez autant de surnageant que possible, et ajoutez 70 µL de FERTIUP® (PM) maintenu à 37°C dans le tube (le volume final doit être approximativement 100 µL).

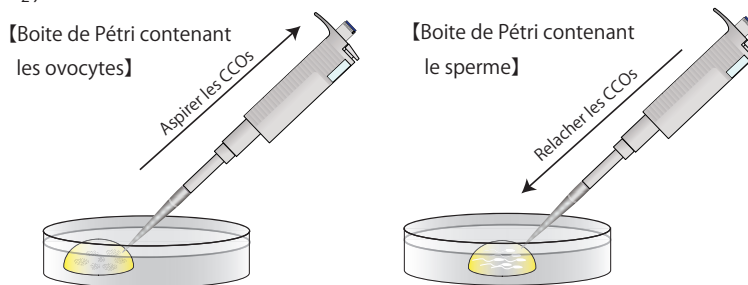


- Pipetez avec précaution, puis transférez tout le contenu dans la goutte de 100 µL de FERTIUP® (PM) (boîte de Pétri contenant le sperme). Placez la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) pendant 30 minutes.

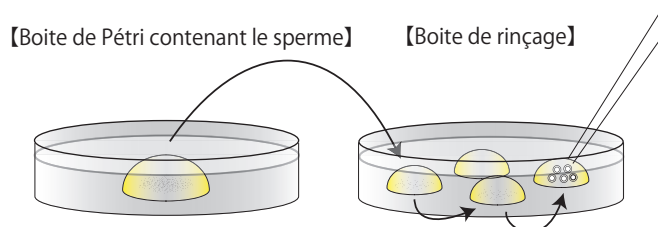


Insémination

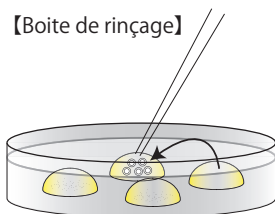
1. Pipetez les CCOs préincubés en minimisant le volume de CARD MEDIUM® transféré (boîte de Pétri contenant les ovocytes). Transférez les CCOs dans la goutte de sperme en suspension (boîte de Pétri contenant le sperme), puis incubez dans l'étuve (37°C, 5% CO₂).



2. Après 3 heures d'incubation, rincez les ovocytes 3 fois dans du mHTF frais (80 µL) dans la boîte de rinçage.



3. Six heures après insémination, observez les ovocytes dans la troisième goutte de mHTF et éliminez les ovocytes parthénogénétiques n'ayant qu'un seul pronucléus. (Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 11)
4. Après une nuit de culture, transférez uniquement les embryons ayant atteint le stade 2 cellules dans la 4ème goutte de mHTF de la boîte de rinçage. Ces embryons peuvent être vitrifiés ou réimplantés. (Reportez-vous aux chapitres Vitrification rapide d'embryons murins en page 54 et Transfer d'embryons dans l'oviducte en page 66).



Références

1. Nakagata N., Takeo T., Fukumoto K., Haruguchi Y., Kondo T., Takeshita Y., Nakamuta Y., Umeno T., and Tsuchiyama S. 2014. Rescue *in vitro* fertilization method for legacy stock of frozen mouse sperm. *J Reprod Dev.* 60(2): 167-170.

4-1 Préparation d'ovocytes microdisséqués au laser

Les spermatozoïdes cryopréservés provenant de certaines lignées, particulièrement de lignées consanguines, peuvent avoir de faibles capacités de fécondation. Afin de contrecarrer ceci, il est possible de microdisséquer les ovocytes au laser avant de procéder à la fécondation *in vitro*.

Matériel and Equipement

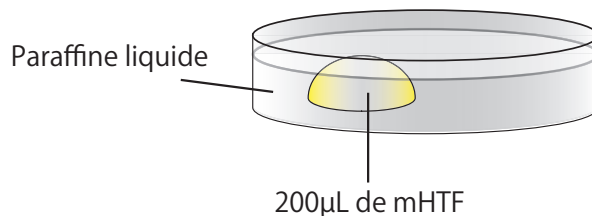
1. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
2. mHTF (Fluide tubal humain modifié)
3. Paraffine liquide
4. Hyaluronidase diluée dans du mHTF (Hyaluronidase, Cat. No. H-3506, Sigma)
5. Système laser Saturn 3 (Research Instruments Ltd, Cornwall, UK)
6. Etuve humidifiée (37°C, 5% CO₂)

Procédure

Préparation du sperme et des boîtes de culture

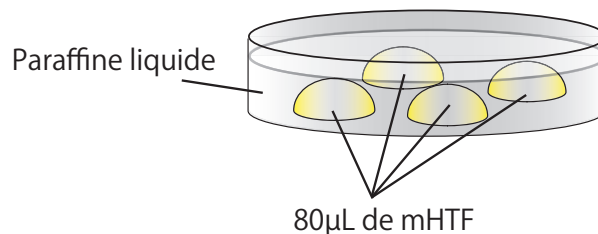
1. Pour la FIV, le sperme doit être préparé en suivant les méthodes décrites aux chapitres Fécondation *In Vitro* en page 8, Fécondation *In Vitro* avec sperme épидидymaire transporté à basse température en page 18, ou Fécondation *In Vitro* avec spermatozoïdes congelés en page 28.
2. Placer 1 goutte de 200 µL de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrir la avec de la paraffine liquide. Placer la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) au minimum 30 minutes.

【Boîte contenant la Hyaluronidase】



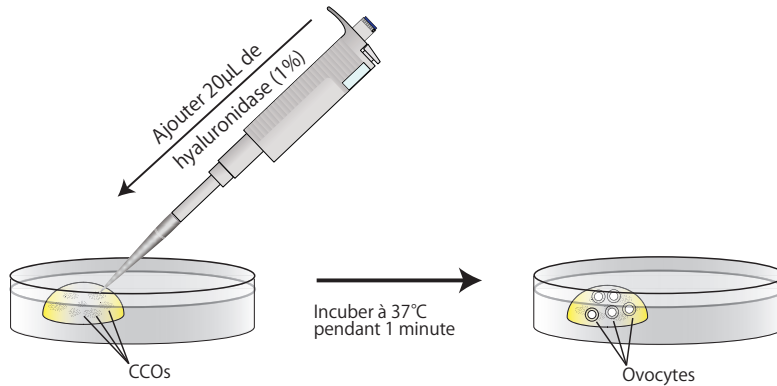
3. Placer 4 gouttes (80 µL / goutte) de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrir avec de la paraffine liquide. Placer la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) 30 minutes minimum.

【Boîte de rinçage】

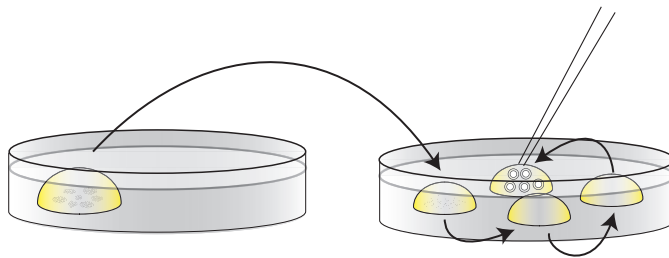


Préparation des ovocytes dénudés

1. Collecter les complexes cumulus-ovocytes (CCOs) des femelles superovulées et introduisez-les dans une goutte de 200 μL de mHTF (boite contenant de la Hyaluronidase).
(Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 6 et 9).
2. Ajouter 20 μL de hyaluronidase (1%) à la goutte de mHTF contenant les CCOs, et placer la boite dans l'étuve (37°C, 5% CO_2) pendant 1 minute.

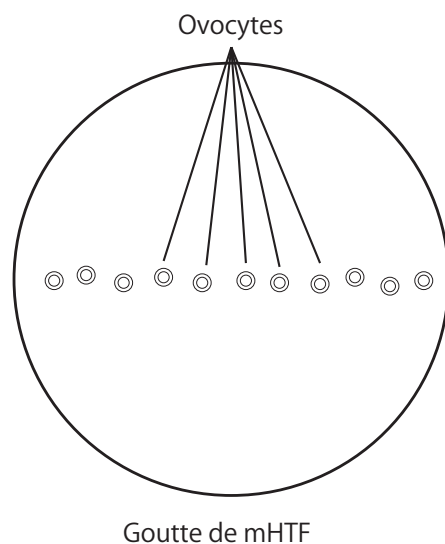


3. Transférer rapidement les ovocytes dans la première goutte de 80 μL de mHTF (boite de rinçage), puis rincer les ovocytes dans les gouttes successives.



Dissection de la zone pellucide au laser

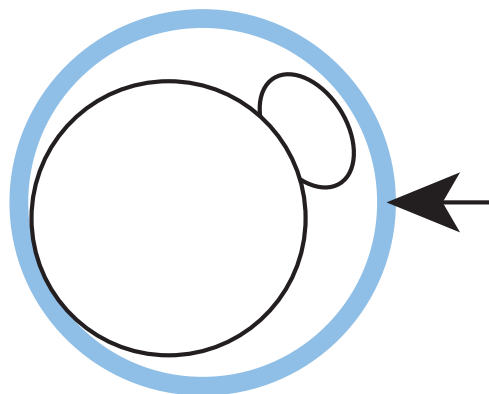
1. Placer une goutte de 100 μL de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrir la avec de la paraffine liquide. Placer la boite dans l'étuve (37°C, 5% CO_2) au minimum 30 minutes.
2. Transférer 50 ovocytes dénudés dans une goutte de 100 μL de mHTF.
3. Aligner les ovocytes sur le fond de la boîte.



Remarque

Si les cellules folliculaires collent à la zone pellucide, celles-ci peuvent être décollées par simple trituration avec la pipette en verre.

- Placer la boîte contenant les ovocytes en position dans le système laser Saturn 3.
- Cibler la zone pellucide à proximité du premier globule polaire and perforer-la avec le faisceau laser.



[Dissection de la Zone Pellucide au Laser] No. 08-01



- Une fois la zone pellucide de tous les ovocytes perforée, transférer-les dans une goutte de CARD MEDIUM® pour y être fécondés.
Placer la boîte dans l'étuve.
(Reportez-vous aux chapitres Fécondation *In Vitro* en page 6, Fécondation *In Vitro* avec sperme épидидymaire transporté à basse température en page 18, et Fécondation *In Vitro* avec spermatozoïdes congelés en page 26).

Références

- Kaneko T., Yanagi M., Nakashima T., and Nakagata N. 2006. The improvement in fertility of cryopreserved mouse spermatozoa showing low fertility using laser-microdissected oocytes. *Reprod. Med. Biol.* 5(4): 249-254.
- Anzai M., Nishiwaki M., Yanagi M., Nakashima T., Kaneko T., Taguchi Y., Tokoro M., Shin SW., Mitani T., Kato H., Matsumoto K., Nakagata N., and Iritani A. 2006. Application of laser-assisted zona drilling to *in vitro* fertilization of cryopreserved mouse oocytes with spermatozoa from a subfertile transgenic mouse. *J Reprod Dev.* 52(5): 601-606.

Note

Pour éviter d'endommager la membrane plasmique des ovocytes, il est recommandé d'orienter le laser là où la zone pellucide est la plus détachée de l'ovocyte.

Note

Le diamètre du trou doit être 10-12.5 μm et la durée du pulse 0.55-0.60 ms.

4-2 Dissection Partielle de la Zone Pellucide (DPZ)

Si vous ne disposez pas d'instruments de microdissection assistée au laser, vous pouvez tout de même disséquer la zone pellucide des ovocytes manuellement avec un stéréomicroscope.

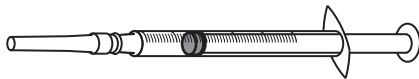
Matériel and Equipement

1. Souris femelles superovulées par PMSG et hCG (Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 6)
2. mHTF (Fluide tubal humain modifié)
3. Hyaluronidase diluée dans du mHTF (Hyaluronidase, Cat. No. H-3506, Sigma)
4. sucrose 0.3M (BSA-)
5. sucrose 0.3M (BSA+)
6. Paraffine liquide
7. Boîtes de Petri en plastique (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
8. Embouts de pipettes (volume de 10 - 100 μ L)
9. Micropipette

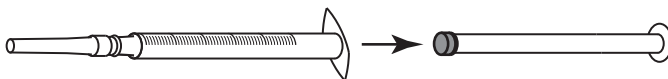
Procédure

Préparation de l'aiguille pour la DPZ

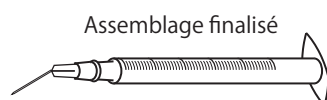
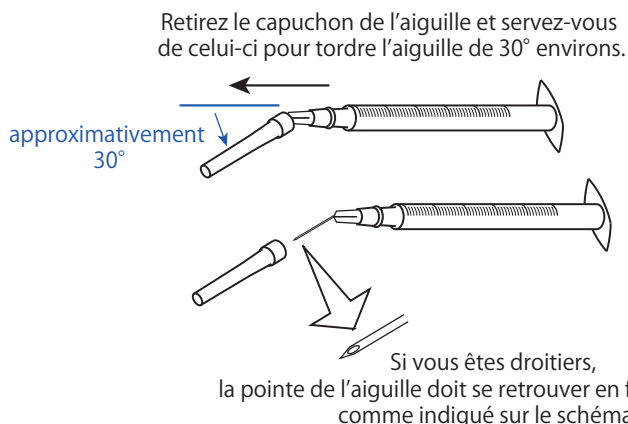
1. Préparer une seringue à usage unique montée avec une aiguille de 30 gauges en suivant la procédure décrite sur le schéma ci-dessous.



Préparer une seringue de 1 mL avec une aiguille de 30 G.



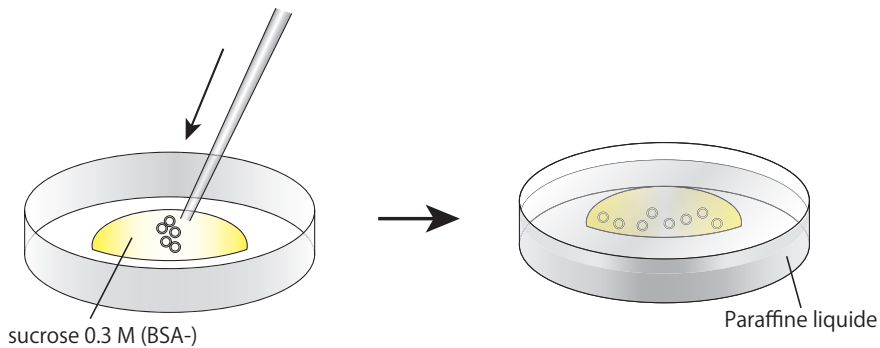
Retirez et débarrassez-vous du piston.



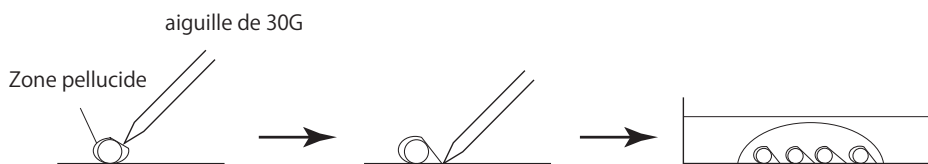
Assemblage finalisé


DPZ

1. Collecter les ovocytes des femelles superovulées 14 à 15 heures après les avoir injectées avec l'hCG. Purifier les ovocytes avec la hyaluronidase. (Reportez-vous aux chapitres Fécondation *In Vitro* en page 9 et préparation des ovocytes microdisséqués au laser en page 37).
2. Introduire les ovocytes dénudés dans la phase supérieure d'une goutte de 100 µL de sucrose 0.3M (BSA-) dans une boîte de culture.
3. Une fois que les ovocytes touchent le fond de la goutte, recouvrez-la de paraffine liquide.

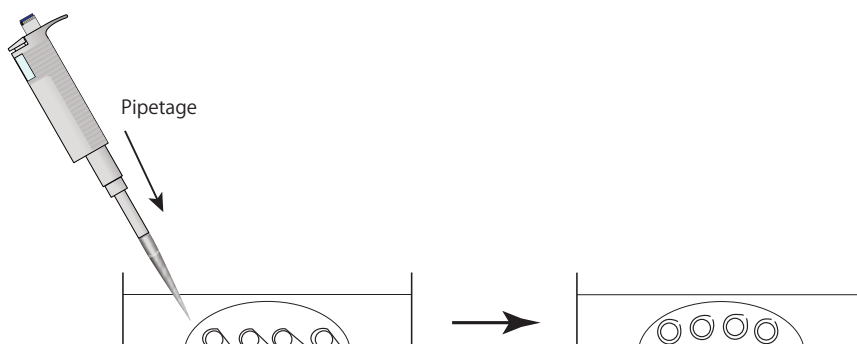


4. Sous le stéréomicroscope, disséquer partiellement la zone pellucide (DPZ) des ovocytes en exerçant un mouvement descendant unique de l'aiguille de 30 gauges.



[DPZ] No. 09-01 

5. Après dissection partielle, neutraliser les attractions électrostatiques entre la zone pellucide et la surface de la boîte de culture en ajoutant 20 µL de sucrose 0.3M (BSA+) à la goutte.
6. Pour détacher les ovocytes partiellement disséqués de la boîte de culture, ajouter la solution de sucrose sur les ovocytes au moyen d'une micropipette.



7. Rincer les ovocytes partiellement disséqués 3 fois dans le CARD MEDIUM® pour éliminer le sucrose résiduel.

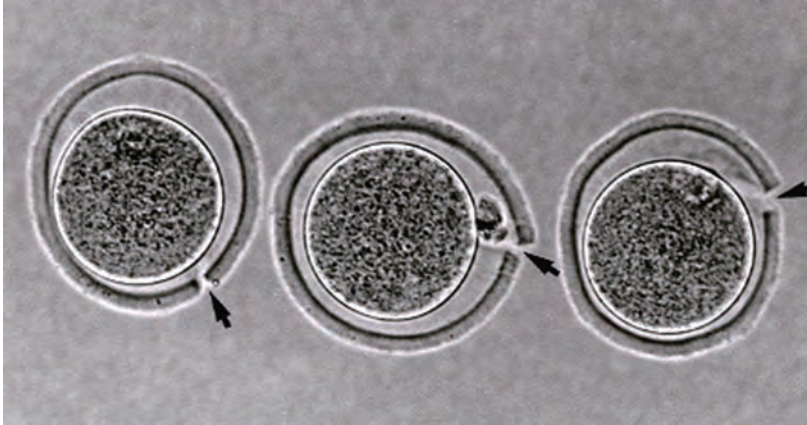
Remarque

Lorsque les ovocytes sont placés dans le sucrose 0.3M (BSA-), l'ovoplasme se contracte à cause des forces osmotiques et électrostatiques qui se créent entre la zone pellucide et la surface de la boîte de culture.

Il en résulte un élargissement de l'espace périvitellin et les ovocytes se retrouvent collés au fond de la boîte de culture.

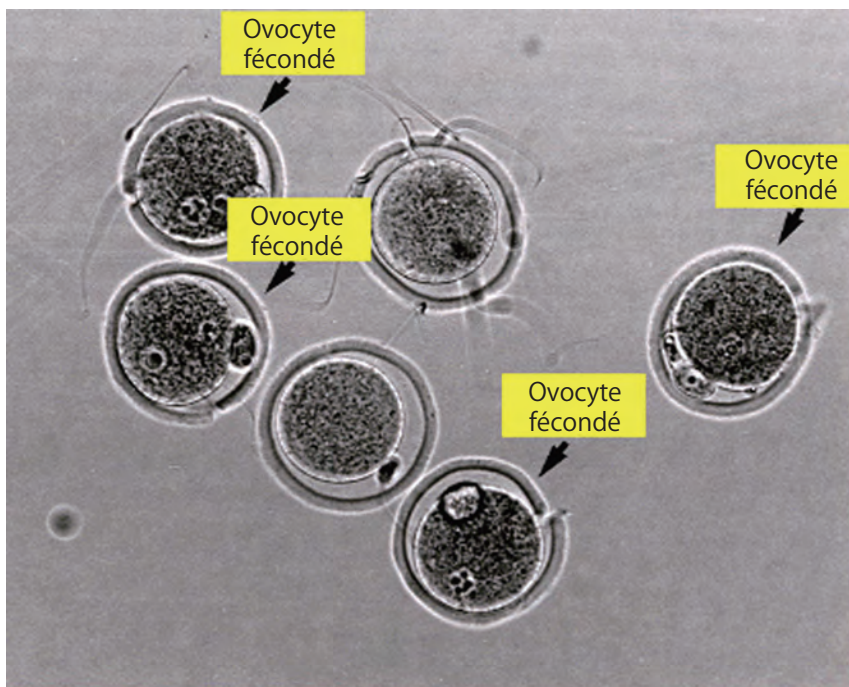
Remarque

Appliquez le sucrose à l'opposé de la fente pour éviter aux ovocytes d'être expulsés de leur zone pellucide.

[Micrographe : Ovocytes partiellement disséqués]

Fécondation *In Vitro* et transfert d'embryons

1. Introduire les ovocytes partiellement disséqués dans le CARD MEDIUM® contenant le sperme préparé au préalable (insémination).
(Reportez-vous aux chapitres Fécondation *In Vitro* en page 6, Fécondation *In Vitro* avec sperme épидидymaire transporté à basse température en page 18, et Fécondation *In Vitro* avec spermatozoïdes congelés en page 26).
2. Trois heures après insémination, rincer les ovocytes fécondés avec précaution dans du mHTF, puis placez-les en culture pendant 3 jours jusqu'à ce qu'ils atteignent le stade blastocyste.

[Micrographe : Ovocytes fécondés]

3. Transférez les blastocystes dans l'utérus d'une femelle receveuse synchronisée au 3ème jour de pseudogestation.
Reportez-vous au chapitre Réimplantation d'embryons par l'utérus en page 72.

Références

1. Nakagata N., Okamoto M., Ueda O., and Suzuki H. 1997. The positive effect of partial zona-pellucida dissection on the *in vitro* fertilizing capacity of cryopreserved C57BL/6J transgenic mouse spermatozoa of low motility. *Biol. Reprod.* 57: 1050-1055.

Remarque

Le transfert d'embryons au stade 2 cellules dans l'oviducte de receveuses synchronisées au 1er jour de pseudogestation résulte en un très faible taux de développement des embryons. Ceci est dû au fait que les blastomères des embryons sont expulsés de la zone pellucide car ils subissent l'action péristaltique de l'oviducte lors de leur progression de l'oviducte jusqu'à l'utérus.

4-3 Collecte d'embryons au stade 2 cellules

Matériel and Equipement

1. Une paire de forceps watchmaker's #5
2. Ciseaux de dissection
3. KSOM/AA
4. Paraffine liquide
5. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
6. Seringue de 1 mL
7. Aiguille (30G tordue)
8. Micropipettes en verre

Procédure

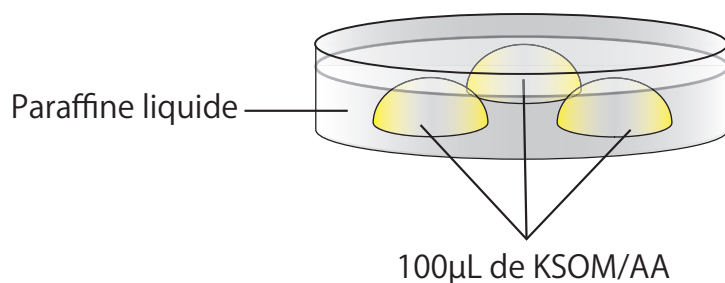
Superovulation et sélection des femelles synchronisées

1. Injecter les femelles (âgées de 10 à 12 semaines) par voie i.p. avec 7.5 IU de PMSG (14:00-18:00).
2. Injecter les femelles par voie i.p. avec 7.5 IU de hCG 48 à 52 heures après l'injection de PMSG, puis accouplez-les immédiatement avec les males.
3. Le lendemain, examiner les femelles pour identifier celles présentant un bouchon vaginal (synchronisées).

Préparation des boîtes de culture

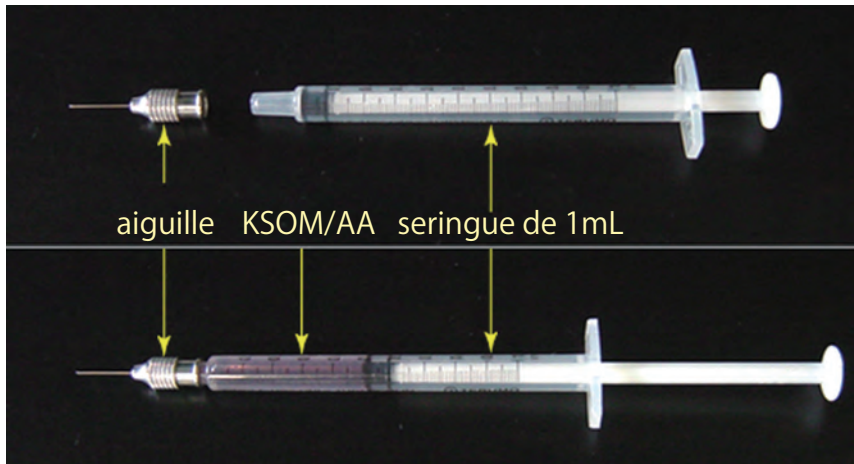
1. Placer 3 gouttes (100 μ L / goutte) de KSOM/AA dans une boîte de Pétri et recouvrir avec de la paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) au minimum 30 minutes.

【Boîte de rinçage】



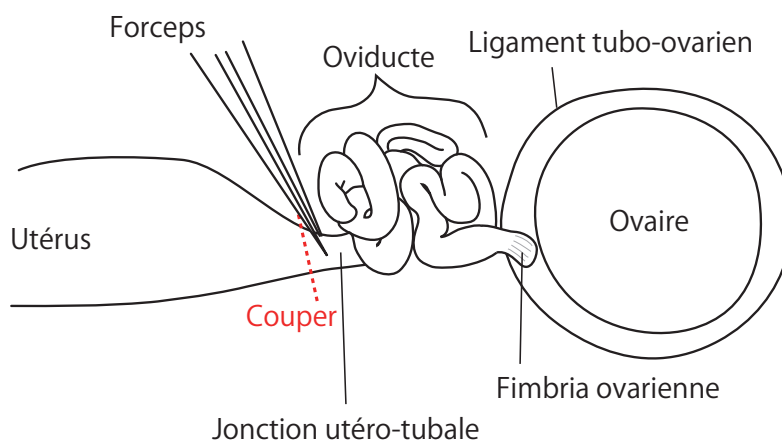
Préparation de l'aiguille

1. Remplir une seringue de KSOM/AA et connectez-la à une aiguille tordue.
2. Tester la seringue en vous assurant qu'elle ne contient pas de bulles d'air, et que le flux de KSOM/AA est régulier.

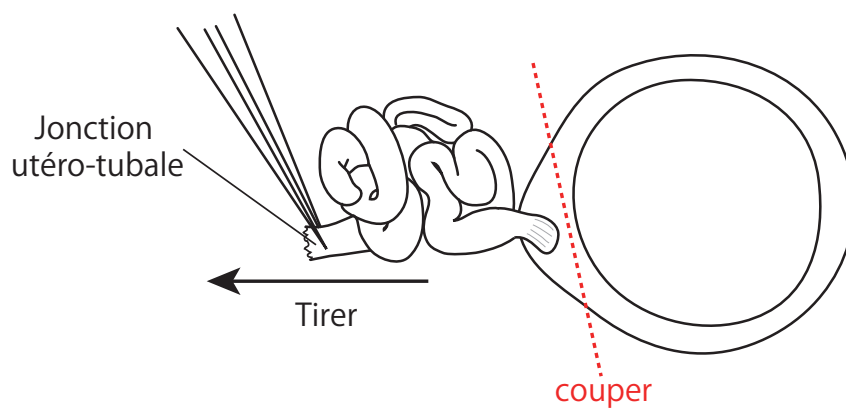


Collection d'embryons

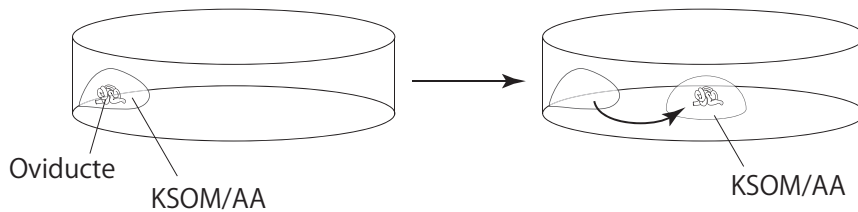
1. Le jour suivant l'identification du bouchon vaginal, disséquer les utérus, oviductes et ovaires, et placez le tout sur un papier filtre stérilisé.
(Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 9.)
2. Immobiliser la jonction utéro-tubale et inciser du côté de l'utérus.



3. Tirer sur la jonction utéro-tubale pour séparer l'infundibulum de l'ovaire et couper le ligament tubo-ovarien.

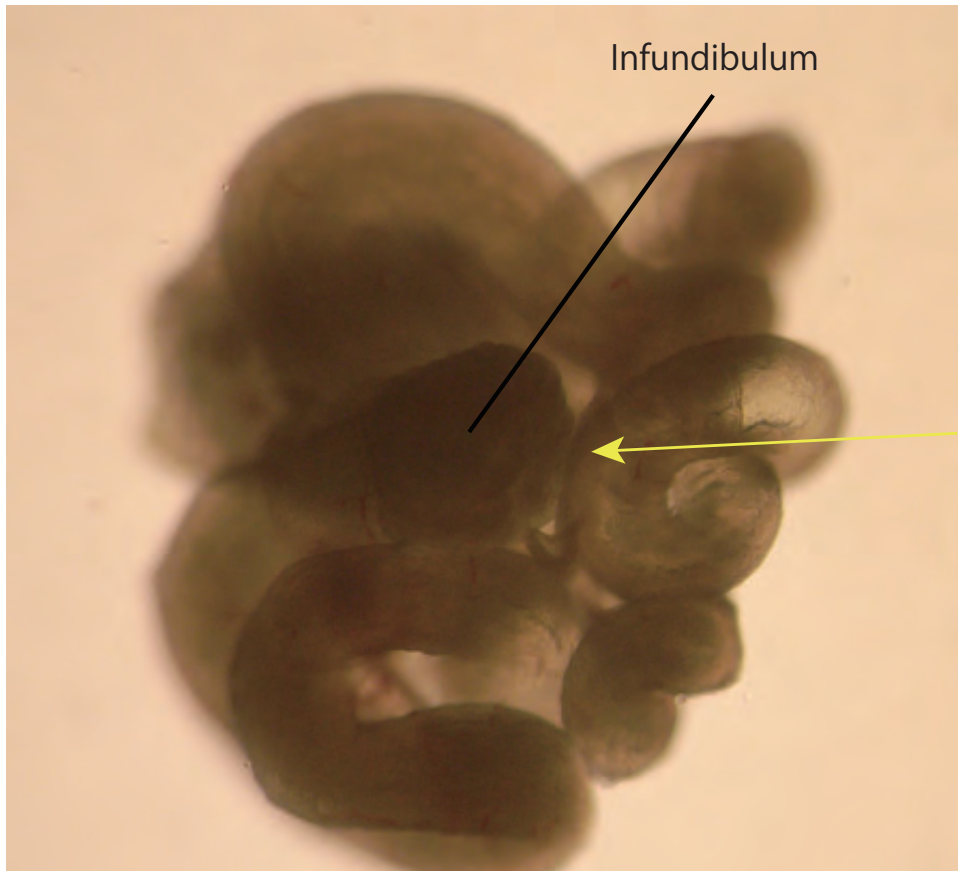


- Après avoir rincé l'oviducte dans une goutte de KSOM/AA, placer-le dans une nouvelle goutte de KSOM/AA.



- Examiner l'oviducte pour localiser l'infundibulum, qui est l'élargissement de l'oviducte à son extrémité.
- Orienter l'oviducte pour permettre à l'aiguille d'être insérée facilement.

[Micrographe : Un oviducte avant manipulation]



- Maintenez l'infundibulum au fond de la boîte de Pétri à l'aide de forceps et insérez-y l'aiguille.

Note

L'infundibulum est souvent caché à l'intérieur des replis de l'oviducte. Par conséquent, l'utilisation de forceps est fortement recommandée pour dérouler avec précaution l'utérus et localiser l'infundibulum.

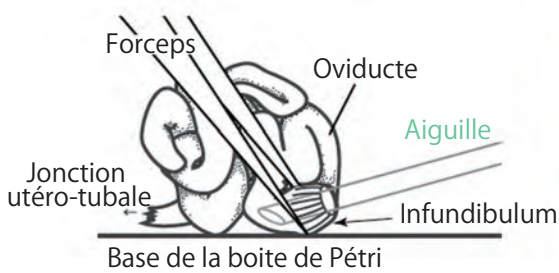
Remarque

Si vous êtes droitier, positionner l'oviducte comme indiqué sur le schéma ci-dessous. Il est plus facile d'introduire l'aiguille dans l'infundibulum dans cette position (comme l'indique la flèche jaune).

Note

L'infundibulum est extrêmement fragile. Les forceps doivent par conséquent être utilisés avec précaution.

8. Presser délicatement le piston pour créer un flux de KSOM/AA dans l'oviducte.

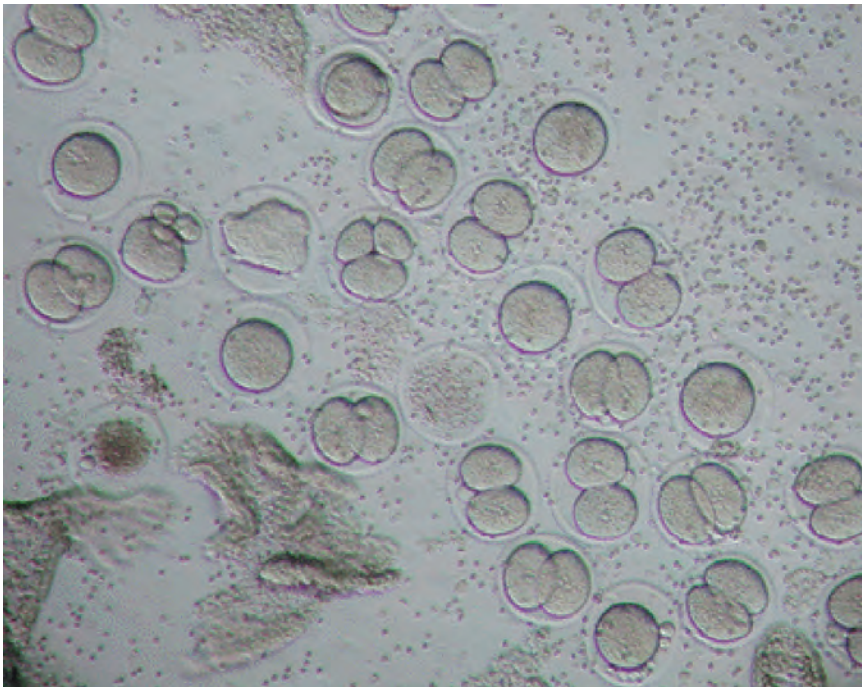


[Manipulation] No. 10-01



9. Collecter les embryons avec un aspirateur buccal et rincer-les dans plusieurs gouttes de KSOM/AA.

[Micrographe : Après avoir expulsé les embryons des Oviductes]



Note

La visualisation de l'expansion de l'oviducte générée par le flux de KSOM/AA indique une manipulation réussie. Il n'est pas recommandé d'introduire l'aiguille n'importe où dans l'oviducte à l'aveugle sous peine d'abimer l'infundibulum et de compromettre la pénétration de l'aiguille.

Note

Assurez-vous d'effectuer toutes les opérations, depuis l'abatage des femelles jusqu'à la manipulation des oviductes en un temps minimum (moins de 5 minutes). Si vous effectuez la procédure sans assistance, assurez-vous de ne pas sacrifier plusieurs souris à la fois. Il est préférable de n'abattre qu'une souris et manipuler ses oviductes rapidement avant de procéder à la dissection de la souris suivante.

Références

1. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., and Behringer R. 2003. Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (Third edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. ISBN 0-87969-591-9.

5-1 Transport d'embryons au stade 2 cellules à basse température

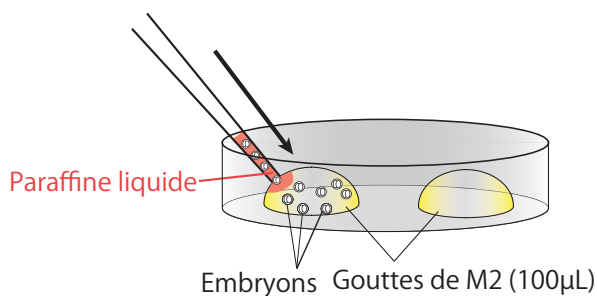
Matériel and Equipement

1. Embryons au stade 2 cellules (fraichement préparés ou décongelés).
2. Boîtes de Pétri en plastique (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
3. Embouts pour dépôt sur gel (Cat. No. 010-R204S; Bio Medical Instrument)
4. M2 (Cat. No. M7167; Sigma)
5. Tube de 0.5mL (Microtubes 0.5mL Fisherbrand Flip Cap; Fisher Scientific Cat. No. FS-MCT-060 -C)
6. Pipettes de transfert
7. KSOM/AA
8. Paraffine liquide
9. Moniteur de température (Thermochron iButton Cat. No. DS1921G; Maxim Integrated Products)
10. Kit de transport réfrigéré CARD (Cat. No. KYD-006-EX, Cosmo Bio Co., Ltd.)
 - Thermos (Cat. No. JMK-501; Thermos K.K.)
 - Boîte en papier (pouvant supporter un tube de 0.5 mL)
 - Coton
 - Blocs réfrigérants (petits et grands)
 - Boîte de transport en polystyrène (Cat. No. KC-3, KARUX)

Procédure

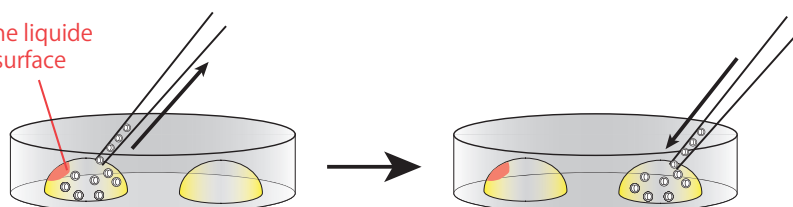
Stockage réfrigéré d'embryons au stade 2 cellules

1. Placer deux gouttes de 100 μ L de M2 dans une boîte de Pétri.
2. Transférer les embryons au stade 2 cellules du milieu de culture à la goutte de M2.

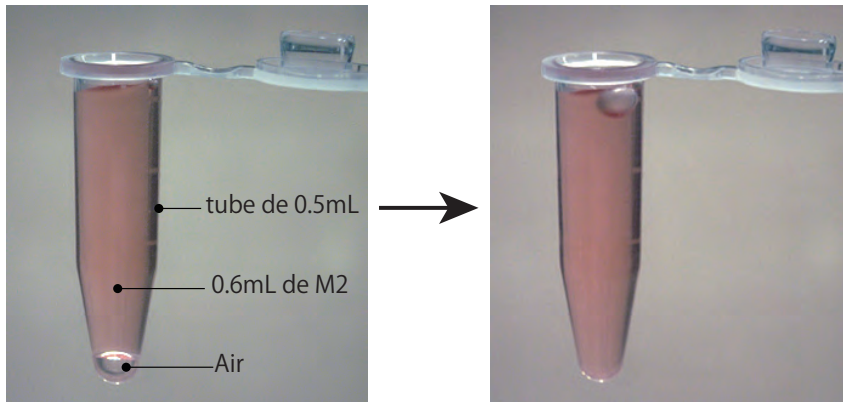


3. Monter un nouveau capillaire à l'aspirateur buccal et aspirer les embryons dans ce nouveau capillaire, en évitant de toucher la paraffine liquide restée sur la goutte de M2. Transférer les embryons dans la goutte de M2 préalablement préparée à l'étape 1.

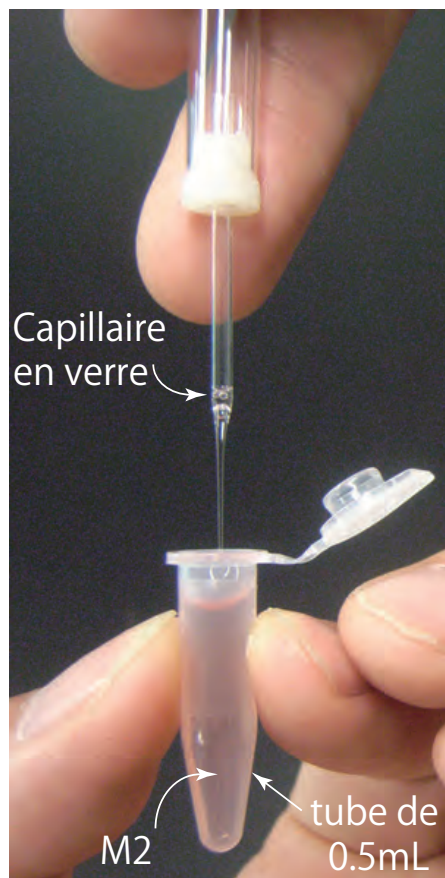
La paraffine liquide
reste à la surface



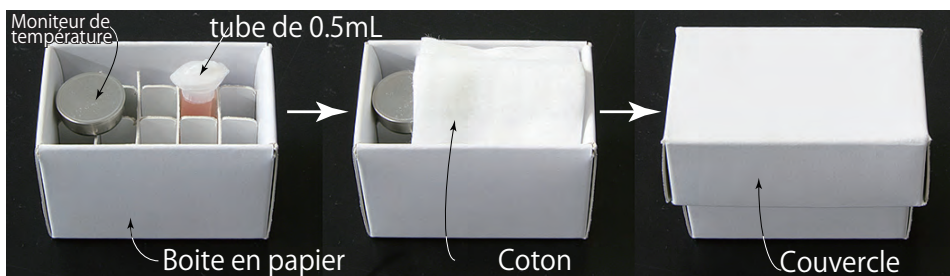
- Remplissez un tube de 0.5 mL avec 0.6 mL de M2 à température ambiante. Si vous observez la présence de bulles au fond du tube, tapoter le tube pour évacuer les bulles.



- Déposer les embryons au fond du tube (40 embryons/tube).



- Placer le tube contenant les embryons, le moniteur de température, et un morceau de coton dans la boîte en papier.



- Placer la boîte en papier dans le réfrigérateur (4-8°C).

Remarque

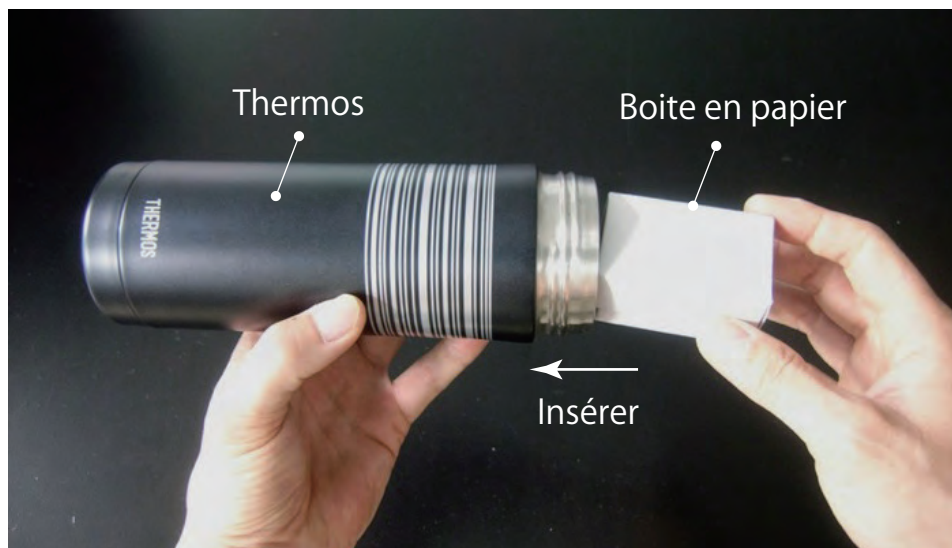
Les embryons maintiennent leurs capacités développementales pendant 72 heures.

Emballage et transport d'embryons au stade 2 cellules

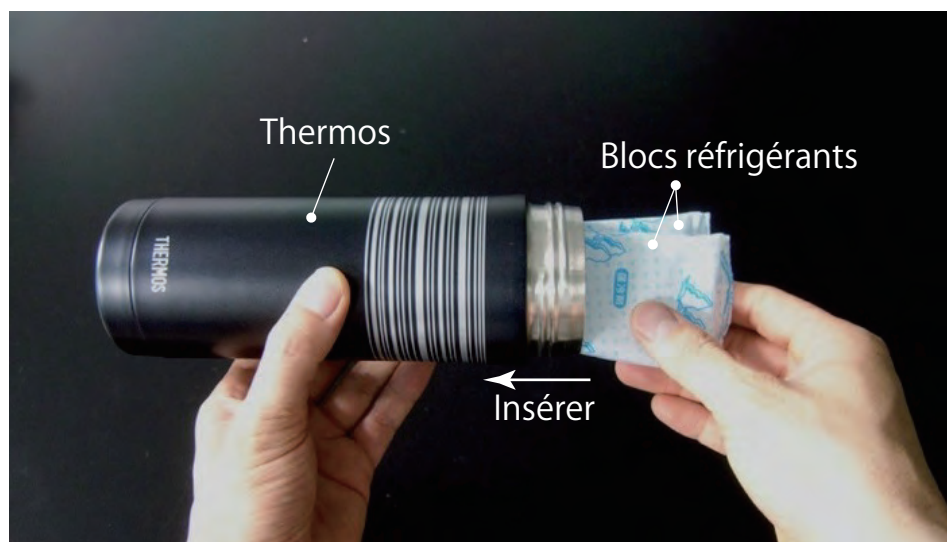
Préparez une boîte en papier contenant les embryons au stade 2 cellules comme détaillé précédemment (Stockage réfrigéré d'embryons au stade 2 cellules).

Les grands blocs réfrigérants et la boîte en polystyrène doivent être refroidis au préalable (4-8°C) avant utilisation. Ceci n'est pas nécessaire pour les petits blocs réfrigérants et le thermos.

1. Placer la boîte en papier contenant les embryons dans le thermos.



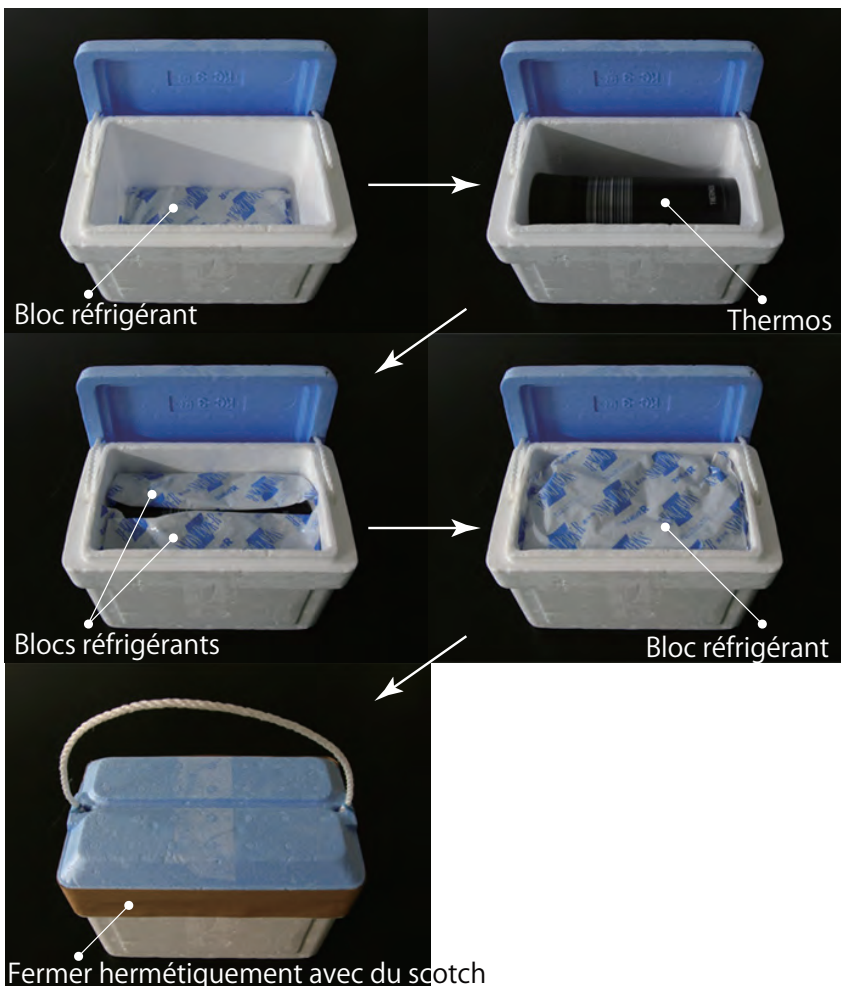
2. Insérer deux petits blocs réfrigérants dans le thermos.



3. Visser le bouchon du thermos.



4. Placer un grand bloc réfrigérant au fond de la boîte en polystyrène et allonger le thermos dessus.
5. Placer un grand bloc réfrigérant de chaque côté du thermos, puis un dernier par-dessus avant de fermer le couvercle.
6. Fermer hermétiquement à l'aide de scotch.



7. Garder la boîte de transport au réfrigérateur jusqu'à la prise en charge par le service postal.
8. Expédier les échantillons par voie postale traditionnelle.

Note

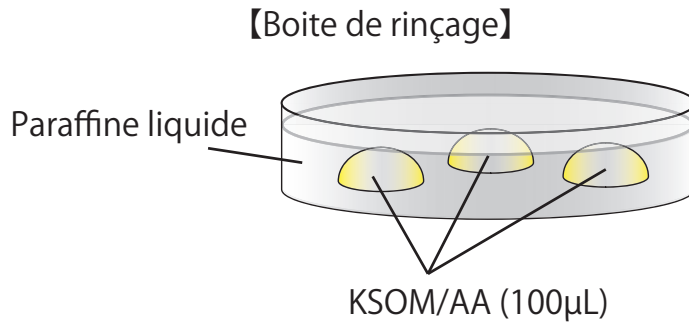
Prenez soin de ne pas retourner la boîte en papier.

Note

Il n'est pas possible de placer le thermos tout au fond de la boîte de transport. Les dimensions du thermos ne lui permettent que d'être placé au centre de la boîte. Ce design est intentionnel afin d'optimiser la protection du thermos lors du transport.

Collection des embryons au stade 2 cellules à l'arrivée de la boîte de Transport.

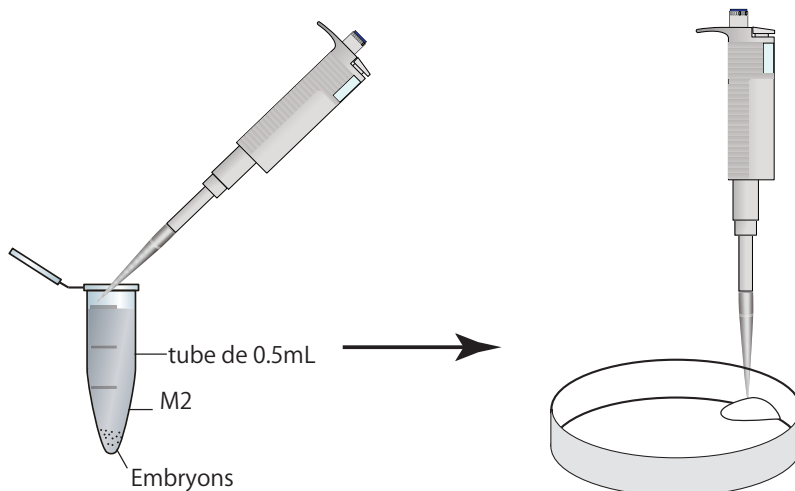
1. Placer 3 gouttes (100 μL / goutte) de KSOM/AA dans une boîte de Pétri et recouvrir avec de la paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO_2) au minimum 30 minutes.



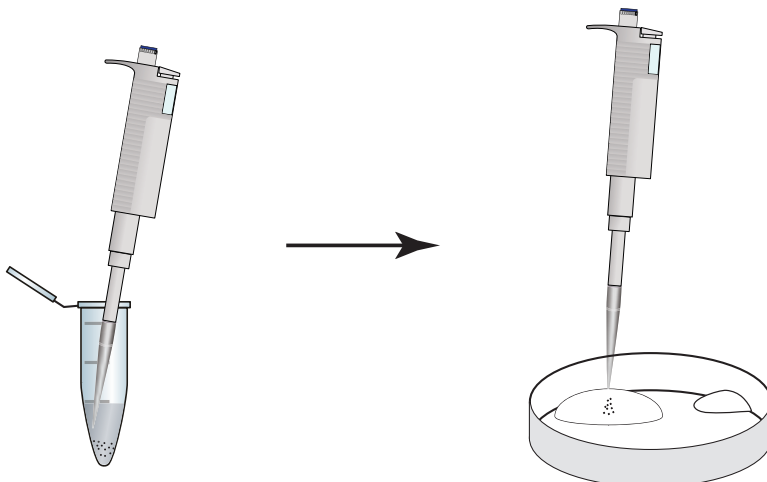
2. Sortir la boîte en papier contenant les échantillons du thermos.
3. Laisser la boîte en papier à température ambiante pendant 30 minutes.

[Réceptionner les échantillons] No. 11-01

4. Ouvrir la boîte en papier et retirer le coton avec précaution. Saisissez le tube contenant les embryons et ouvrez-le.
5. Prélever 200 μL de M2 de la phase supérieure en utilisant un embout pour dépôt sur gel, puis déposer le M2 sur le bord de la boîte de Pétri.



6. Prélever avec précaution le reste de M2 avec un embout pour dépôt sur gel, puis déposer le M2 sur au centre de la boîte de Pétri.

**Note**

Les embryons doivent être maintenus réfrigérés pendant toute la durée du transport. Assurez-vous que ces conditions soient remplies auprès du service postal.

Remarque

Les embryons maintiennent leurs capacités développementales pendant 72 heures.

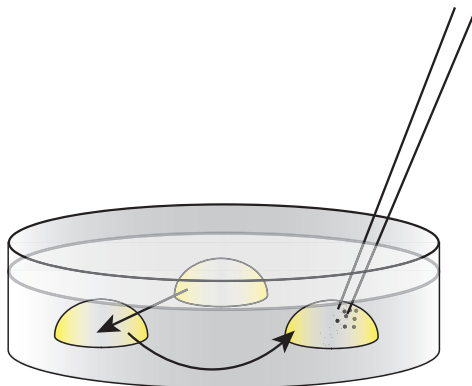
Remarque

Ce temps de repos de 30 minutes permet de s'assurer que les embryons reposent au fond du tube.

Note

Prenez soin de ne pas aspirer de bulles d'air dans l'embout pour dépôt sur gel.

7. Prélever les embryons du M2, et transférer-les successivement dans les trois gouttes de 100 μ L de KSOM/AA pour les rincer.



8. Transférer les embryons dans l'oviducte d'une souris en pseudogestation.

Références

1. Takeo T., Kaneko T., Haruguchi Y., Fukumoto K., Machida H., Koga M., Nakagawa Y., Takeshita Y., Matsuguma T., Tsuchiyama S., Shimizu N., Hasegawa T., Goto M., Miyachi H., Anzai M., Nakatsukasa E., Nomaru K., and Nakagata N. 2009. Birth of mice from vitrified/warmed 2-cell embryos transported at a cold temperature. *Cryobiology*. **58**(2): 196-202.
2. Takeo T., Kondo T., Haruguchi Y., Fukumoto K., Nakagawa Y., Takeshita Y., Nakamura Y., Tsuchiyama S., Shimizu N., Hasegawa T., Goto M., Miyachi H., Anzai M., Fujikawa R., Nomaru K., Kaneko T., Itagaki Y., and Nakagata N. 2010. Short-term storage and transport at cold temperatures of 2-cell mouse embryos produced by cryopreserved sperm. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. **49**(4): 415-419.

Note

Si quelques embryons sont restés dans le tube après transfert, rincer les parois internes du tube avec 200 μ L de M2.

Remarque

Dans l'idéale, la réimplantation des embryons sur les souris pseudogestatives doit être effectuée immédiatement à l'arrivée.

5-2 Transport d'oviductes contenant des embryons au stade 2 cellules à basse température (0°C)

Matériel and Equipement

1. Sucrose 0.8 M
2. PB1
3. KSOM/AA
4. Sachet en plastique
5. Thermos
6. Glace pilée
7. Cryotubes à fond conique (Cat. No. 366656; NUNC)
8. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)

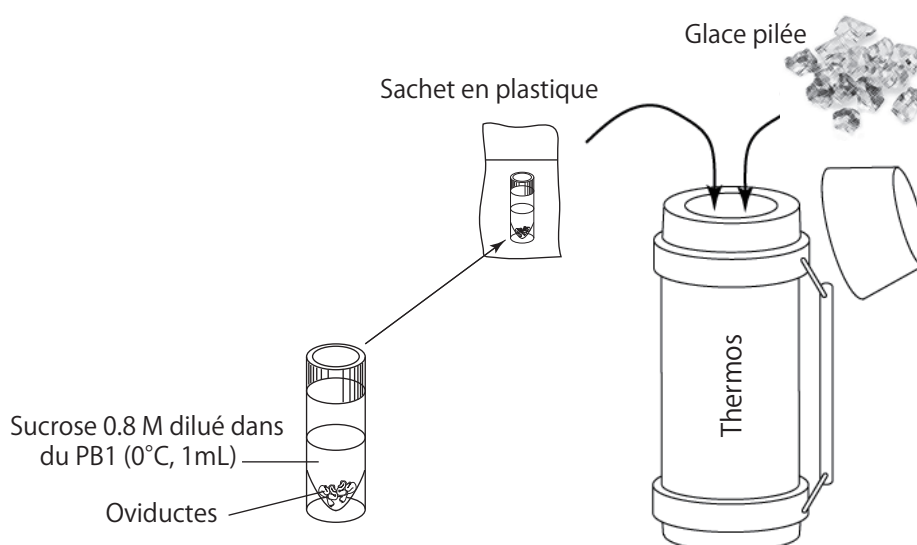
Procédure

Dissection des oviductes de femelles superovulées avec bouchons vaginaux

1. Injecter les femelles (âgées de 10 à 12 semaines) par voie i.p. avec 7.5 IU de PMSG (14:00-18:00).
2. Injecter les femelles par voie i.p. avec 7.5 IU de hCG 48 à 52 heures après l'injection de PMSG, puis accouplez-les immédiatement avec les males.
3. Le lendemain matin (jusqu'à midi), examiner les femelles pour identifier celles présentant un bouchon vaginal (Reportez-vous au chapitre Réimplantation d'embryons par l'oviducte en page 66).
4. Sacrifier les femelles sélectionnées 44 à 46 heures après l'injection de hCG.
5. Disséquer les oviductes des femelles et transférez-les dans une goutte de sucrose à 0°C (100-200 µL – 0.8 M). (Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 9).

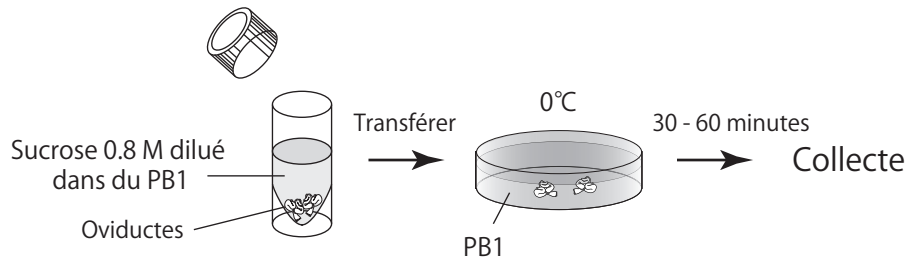
Transport des oviductes

1. Transférer les oviductes dans un cryotube contenant 1 mL de sucrose 0.8 M (0°C).
2. Placer le tube dans un sachet en plastique et fermer hermétiquement.
3. Placer le sachet en plastique dans le thermos contenant la glace pilée et expédier le tout par service postal.



Réception des embryons

1. Retirer le tube du thermos.
2. Collecter les oviductes et placer-les dans la solution de PB1 (0°C) pendant 30 à 60 minutes.
3. Rincer les oviductes avec du PB1 (0°C). (Reportez-vous au chapitre Collecte d'Embryons au stade 2 cellules en page 42.)
4. Rincer les embryons dans 3 cycles successifs de KSOM/AA (37°C) fraîchement préparé.



Références

1. Kamimura E., Nakashima T., Ogawa M., Ohwada K., and Nakagata N. 2003. Study of low-temperature (4°C) transport of mouse two-cell embryos enclosed in oviducts. *Comp. Med.* 53: 393-396.
2. Ogawa M., Fuchiwaki M., Valdez Jr. Delgado M., Yanagita T., Ide Y., Fukumoto K., Machida H., Kawabe T., Kaneko T., Kasai M., and Nakagata N. 2005. Development after freeze-thawing of mouse embryos collected from oviducts transported at 0°C. *Exp. Anim.* 54(3) Suppl: 242.

Note

Les embryons dégènèrent rapidement si l'étape 2 est omise.

Note

Les oviductes ne doivent pas être maintenus dans le tube au-delà de 48 heures, auquel cas les embryons dégènèrent.

Les embryons doivent être transportés congelés s'ils ne sont pas utilisés immédiatement à l'arrivée.

(Reportez-vous au chapitre Vitriification simple d'embryons murins en page 54).

6-1 Simple vitrification d'embryons murins

Matériel and Equipement

1. DMSO 1 M
2. DAP213
3. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
4. Microfiltre (Millex-GV 0.22 μm Cat. No. SLGV013SL; MILLIPORE)
5. Embouts pour dépôt sur gel (MBP Gel 200, Cat. No. 3621; Molecular BioProducts)
6. Pipettes de transfert
7. Cryotubes (Cryogenic Vials Cat. No. MS-4501W; Sumitomo Bakelite, Japan - alternative : Cat. No. 366656; NUNC.)
8. Micropipette
9. Porte-tubes
10. Bloc réfrigérant Nalgene (Cat. No. 5115-0012; NALGENE, USA)
11. Azote liquide
12. Microscope
13. Sucrose 0.25 M
14. KSOM/AA
15. Paraffine liquide

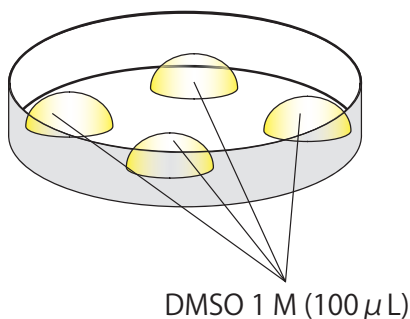
Procédure

Préparation du bloc réfrigérant et des cryotubes

1. La veille de la vitrification placer le bloc réfrigérant (Cat. No. 5115-0012; NALGENE, USA) au congélateur à -20°C .
2. Retirer le bloc réfrigérant du congélateur dix minutes environ avant de commencer la vitrification.
3. Placer les cryotubes dans le bloc réfrigérant. Pour calculer le nombre de cryotubes nécessaires, considérez que chaque cryotube contienne environ 40 embryons.
4. Juste avant de commencer la procédure, vérifier que la température dans les tubes est bien 0°C .

Vitrification

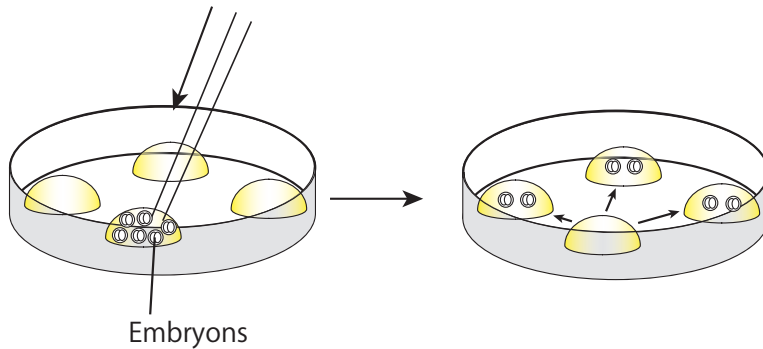
1. Filtrer le DMSO 1 M et disposez 4 gouttes ($\sim 100 \mu\text{L}$ / goutte) dans une boîte de Pétri. La première goutte sert à rincer les embryons, alors que les autres gouttes servent à contenir les embryons préalablement rincés.



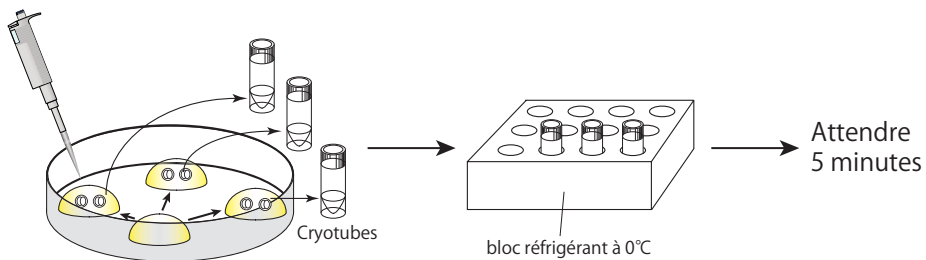
Remarque

Le block réfrigérant peut être substitué par de la glace pilée.

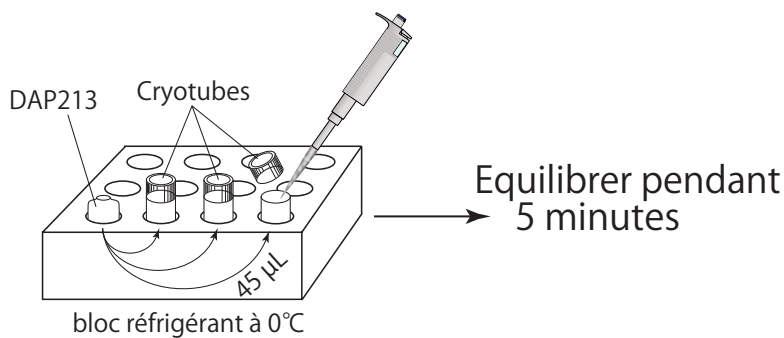
- Déposer les embryons dans la première goutte pour les rincer du milieu de collection. Diviser le total en lots égaux et transférer les embryons dans les gouttes respectives. Par exemple, si vous disposez de 120 embryons dans la goutte de rinçage, séparez-les en groupes de 40 dans les trois autres gouttes. Ces échantillons seront ensuite placés dans les cryotubes pour être vitrifiés.



- Monter un embout pour dépôt sur gel sur une pipette de 20 μL et pipeter les embryons dans un volume total de 5 μL de DMSO 1 M. Déposer les embryons dans un cryotube et placer le tube dans le bloc réfrigérant à 0°C pendant 5 minutes.



- Ajouter 45 μL d'agent cryoprotecteur (DAP213) à 0°C dans le cryotube et équilibrez le tout pendant 5 minutes dans le bloc réfrigérant.



Note

Maintenir les cryotubes dans le bloc réfrigérant pour plus de 5 minutes n'est pas un problème (<20 minutes).

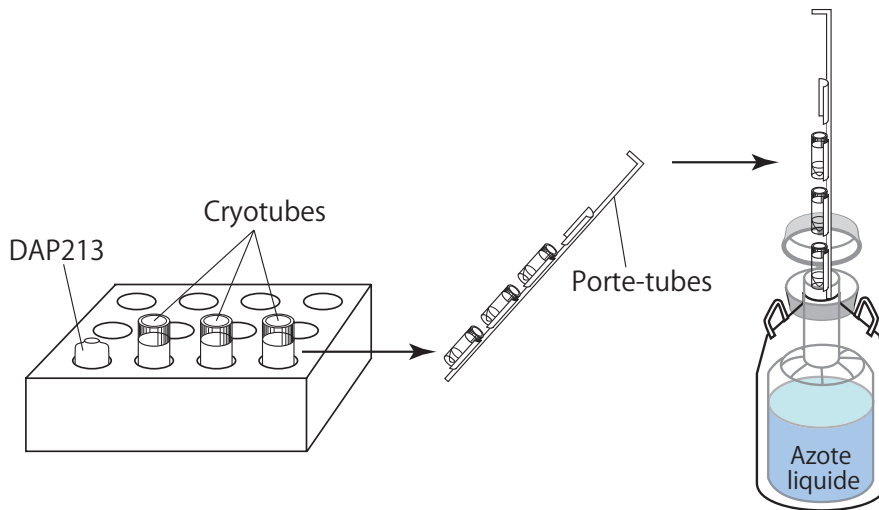
Note

Il est recommandé de regrouper les embryons au centre de la goutte pour faciliter le pipetage dans un volume limité à 5 μL de DMSO 1 M.

Note

Prenez garde de ne pas trop visser le bouchon après avoir ajouté le DAP213, sans quoi il risque d'être difficile de le dévisser rapidement pour raviver les embryons.

- Placer les cryotubes rapidement sur le porte-tubes et immerger les tubes directement dans l'azote liquide.

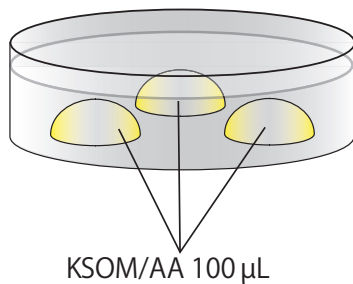


[Vitrification des Embryons] No. 13-01 

Préparation pour la décongélation

- Placer 3 gouttes (100 μ L/goutte) de KSOM/AA dans une boîte de Pétri et recouvrez-les de paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) au minimum 30 minutes.

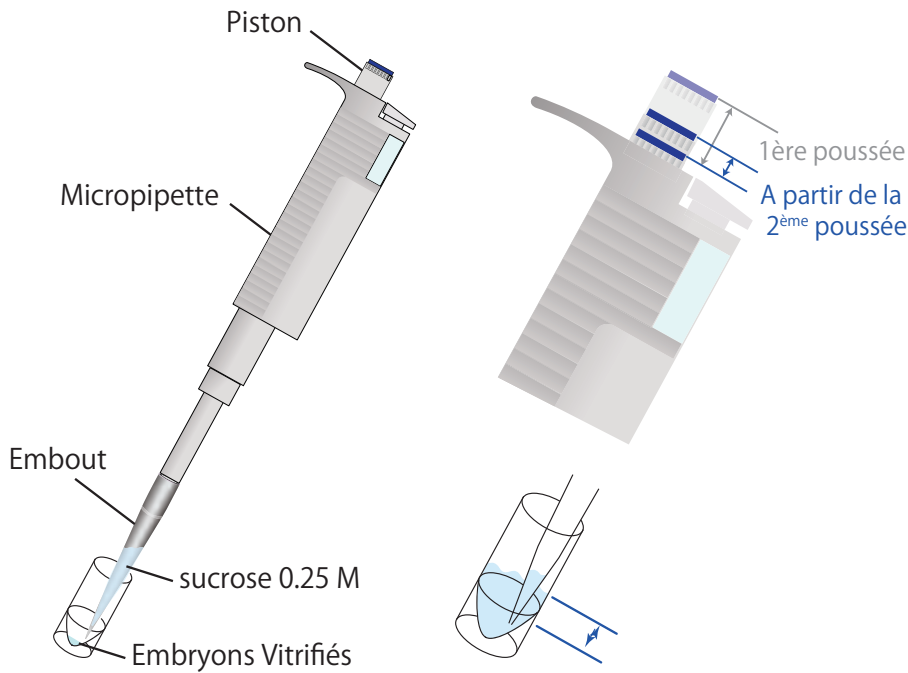
【Boîte de rinçage】



- Préchauffer la solution de sucre 0.25 M dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) avant de l'utiliser.

Raviver les embryons congelés

- Retirer un cryotube de l'azote liquide et ouvrir le bouchon. Vider l'azote liquide restant dans le tube et laisser le tube se réchauffer à température ambiante pendant 30 secondes.
- Ajouter 0.9 mL de sucre 0.25 M (préchauffé à 37°C) dans le cryotube et pipeter plusieurs fois pour réchauffer l'échantillon. Lors du pipetage, prenez soin de ne pas trop créer de bulles ou d'endommager les embryons. Transférer le contenu du cryotube dans une boîte de Pétri.




L'embout ne doit pas toucher le fond du cryotube, sinon la solution de sucrose 0.25 M congèle immédiatement et il devient impossible de la pipeter.


Pressez une première fois sur le piston jusqu'à la deuxième butée pour libérer le volume entier (0.9 mL) de sucrose 0.25 M. Subséquemment, pressez sur le piston une dizaine de fois jusqu'à la première butée pour ne déplacer qu'un petit volume de sucrose 0.25 M. Ceci permet d'éviter la formation de bulles dans le sucrose 0.25 M.

- Ajouter 0.4-0.5 mL de sucrose 0.25 M dans le cryotube and transférer à nouveau le contenu dans la boîte de Pétri. Cette opération permet de diluer l'agent cryoprotecteur et sert aussi à récupérer les derniers embryons restés dans le tube.

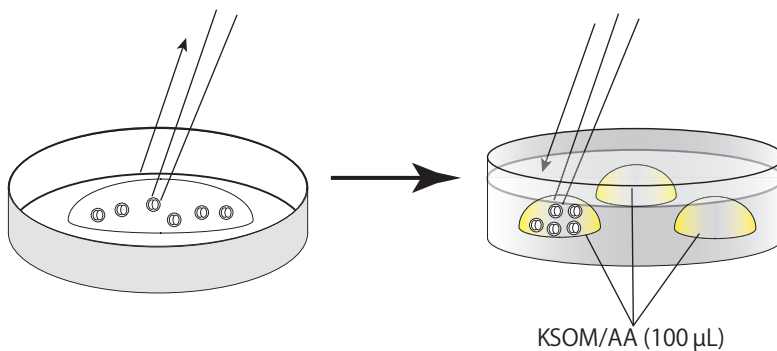
[Raviver les Embryons Vitrifés]

No. 13-02 

[Pipetage pour Raviver les Embryons Vitrifés]

No. 13-03 

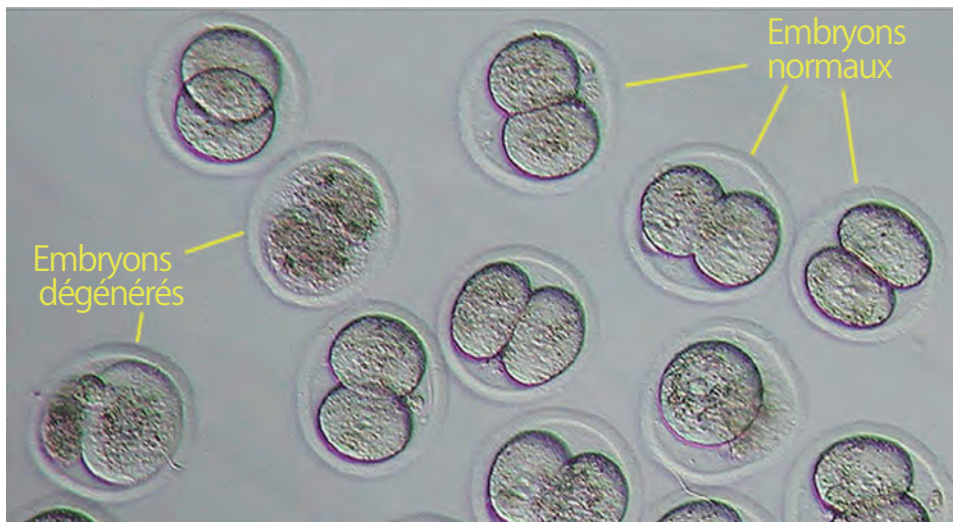
- Aspirer les embryons et transférer-les dans une goutte de KSOM/AA (boîte de rinçage) puis placer la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO₂).



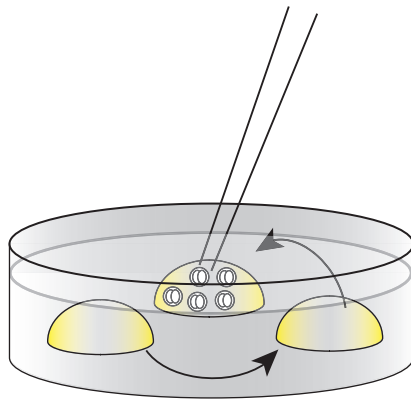
Note

Il est très important de réchauffer l'échantillon le plus rapidement possible pour éviter que l'agent cryoprotecteur (DAP213) devienne toxique pour les embryons.

[Micrographe : Embryons Ravivés après Vitrification]



5. Au bout de 10 minutes, rincer les embryons dans 2 cycles successifs de KSOM/AA (37°C) fraîchement préparé.



Références

1. Nakagata N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fert.* **87**: 479-483.
2. Nakagata N. 1993. Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by *in vitro* fertilization between cryopreserved gametes. *J. Reprod. Fert.* **99**: 77-80.
3. Nakagata N. 1995. Studies on cryopreservation of embryos and gametes in mice. *Exp. Anim.* **44**: 1-8.
4. Nakao K., Nakagata N., and Katsuki M. 1997. Simple and efficient procedure for cryopreservation of mouse embryos by simple vitrification. *Exp. Anim.* **46**: 231-234.

6-2 Simple vitrification d'ovocytes murins

Matériel and Equipement

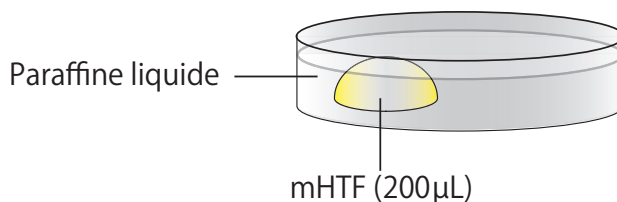
1. Souris femelles superovulées avec PMSG et hCG
2. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
3. Paraffine liquide
4. Micropipette
5. Embouts de pipettes
6. mHTF
7. Hyaluronidase (1%) diluée dans du mHTF
8. Sérum foetal de bœuf (FBS Cat. No. 26140-087; Gibco)
9. Microfiltre (Millex-GV 0.22 μm Cat. No. SLGV013SL; MILLIPORE)
10. Capillaires en verre pour manipuler les embryons
11. Etuve humidifiée (37°C, 5% CO₂)
12. Matériel et équipement utilisés pour la vitrification et la décongélation des embryons (Reportez-vous aux chapitre Vitrification simple d'embryons murins en page 54).

Procédure

Préparation des boîtes de Pétri

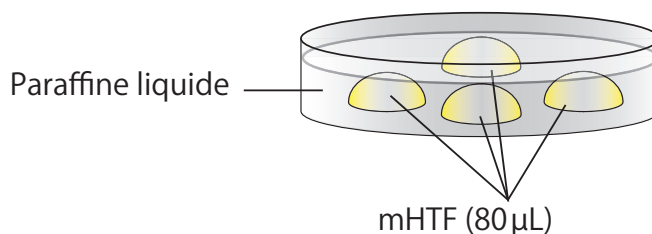
1. Placer 1 goutte de 200 μL de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrez-la de paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) au minimum 30 minutes.

【Boîte contenant les Ovocytes】



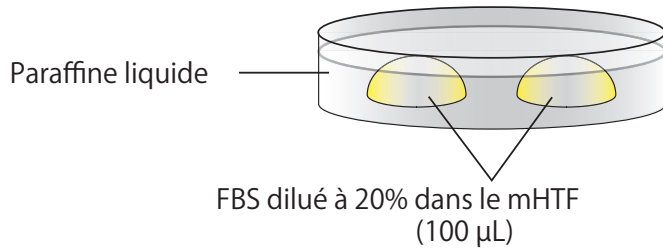
2. Placer 4 gouttes (80 μL /goutte) de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrez-les de paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) au minimum 30 minutes.

【Boîte de rinçage】



- Diluer le sérum fœtal de bœuf (FBS) à 20% dans le mHTF et stérilisez par filtration. Placer 2 gouttes (100 μL /goutte) de ce milieu dans une boîte de Pétri et recouvrez-les de paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO_2) au minimum 30 minutes.

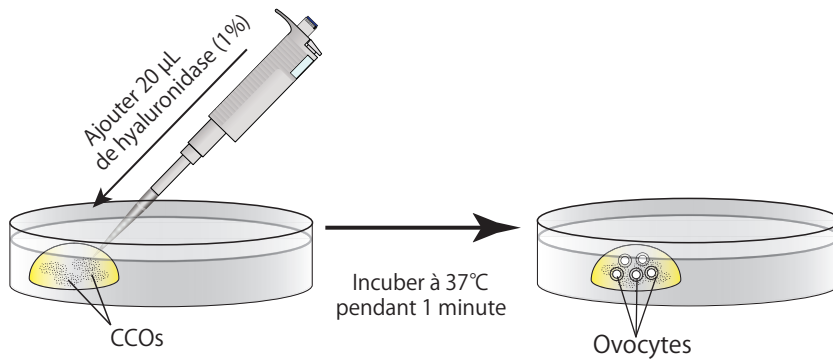
【Boîte contenant du FBS】



Préparation des ovocytes dénudés

- Collecter les complexes cumulus-ovocytes (CCOs) des oviductes de femelles superovulées et placer-les dans la goutte de 200 μL de mHTF (boîte contenant les ovocytes).
- Ajouter 20 μL de hyaluronidase (1%) à la goutte de mHTF contenant les CCOs et placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO_2) pendant 1 minute.

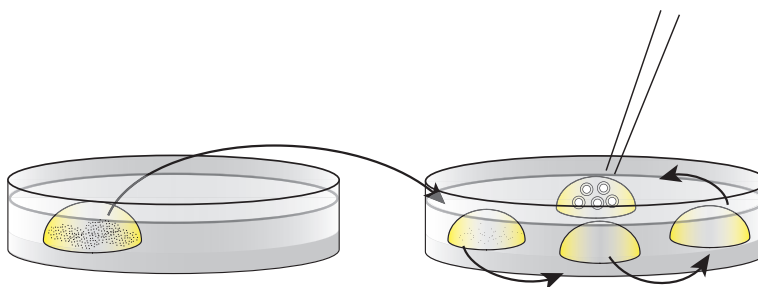
【Boîte contenant les ovocytes】



- Collecter et transférer rapidement les ovocytes dans la première goutte de 80 μL de mHTF (boîte de rinçage), puis transférer les ovocytes dans les 3 autres gouttes.

【Boîte contenant les ovocytes】

【Boîte de rinçage】



Note

Assurez-vous d'effectuer toutes les opérations, depuis l'abatage des femelles et la collecte des oviductes jusqu'à l'immersion des CCOs dans la goutte de mHTF en un minimum de temps (30 secondes maximum).

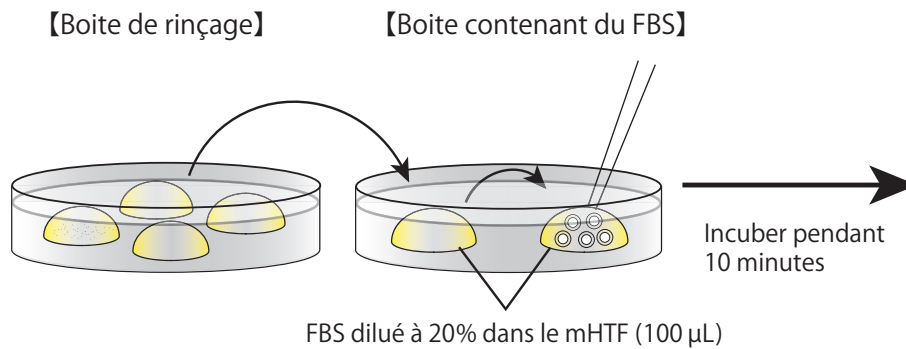
Si vous effectuez la procédure sans assistance, assurez-vous de ne pas sacrifier plusieurs souris à la fois. Il est préférable de n'abattre qu'une souris et prélever ses oviductes rapidement avant de procéder à la dissection de la souris suivante.

Remarque

Si les cellules folliculaires collent à la zone pellucide, celles-ci peuvent être décollées par simple trituration avec la pipette en verre.

Culture des ovocytes dans une goutte contenant du FBS

1. Placer les ovocytes dans la première goutte de FBS pour les rincer, puis les transférer dans la deuxième goutte où ils seront incubés 10 minutes dans l'étuve (37°C, 5% CO₂).



Remarque

Le FBS joue un rôle de prévention du durcissement de la zone pellicule durant la vitrification et la décongélation.

Simple vitrification d'ovocytes murins

1. Les ovocytes peuvent être vitrifiés en utilisant la méthode de simple vitrification. Toutefois il est nécessaire de se débarrasser au préalable des cellules folliculaires et de placer les ovocytes en culture dans une goutte contenant du FBS. En outre, la méthode de décongélation est similaire à celle utilisée pour les embryons (Reportez-vous au chapitre Vitrification rapide d'embryons murins en page 54).

Fécondation *In Vitro* à partir d'ovocytes congelés

1. Les ovocytes vitrifiés peuvent être utilisés pour effectuer une fécondation *in vitro* à partir de sperme frais, transporté à basse température, ou même congelé.
2. (Reportez-vous aux chapitres Fécondation *In Vitro* en page 6, Fécondation *In Vitro* avec sperme épидидymaire transporté à basse température en page 18, et Fécondation *In Vitro* avec spermatozoïdes congelés en page 26).

Références

1. Nakagata N., Takeo T., Fukumoto K., Kondo T., Haruguchi Y., Takeshita Y., Nakamuta Y., Matsunaga H., Tsuchiyama S., Ishizuka Y., Araki K. 2013. Applications of cryopreserved unfertilized mouse oocytes for *in vitro* fertilization. *Cryobiology*. 67(2):188-92.

Note

Il y a trois méthodes différentes pour préparer le CARD MEDIUM®, selon que la fécondation *in vitro* est faite à partir de sperme frais, congelé, ou réfrigéré. Reportez-vous au manuel d'instruction du CARD MEDIUM® pour plus de détails.

6-3 Vitrification et transplantation d'ovaires

Matériel and Equipement

1. Boîtes de Pétri de 35mm stériles
2. mWM
3. Donneuse : souris femelle (âgée de 1 jour à 30 semaines)
4. Receveuse : souris femelle âgée de 4 semaines et de lignée histocompatible avec l'ovaire à transplanter).
5. Anesthésiants
6. Micro-ciseaux à ressorts (lame de 5mm)
7. Une paire de forceps watchmaker's #5
8. Agrafes de suture (Autoclip 9mm; Clay Adams 427631) et applicateur d'agrafes (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams 427630)
9. Plaque chauffante (37°C)

Procédure

Dissection des ovaires

1. Sacrifiez la femelle donneuse et disséquez ses ovaires (Reportez-vous au chapitre Fécondation *In Vitro* en page 9).
2. Placez les ovaires dans une boîte contenant suffisamment de mWM.

Vitrification

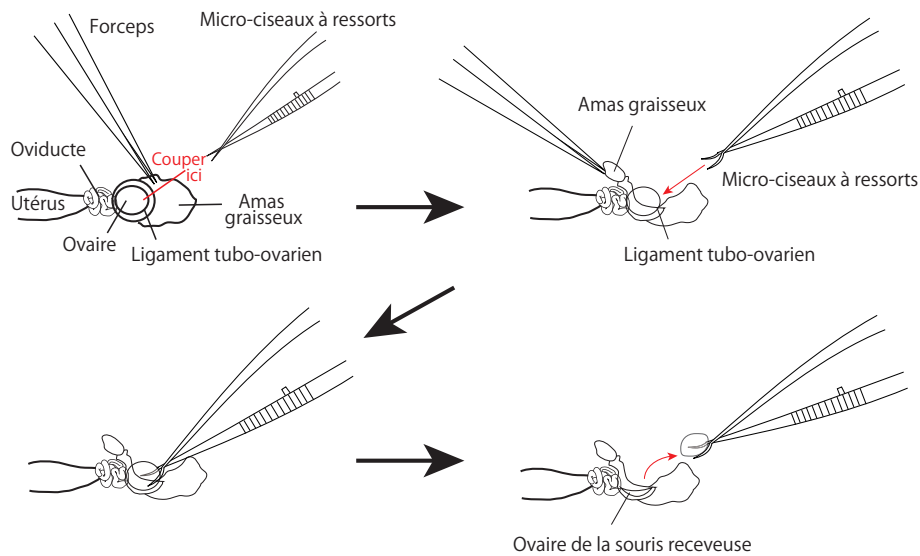
1. Les ovaires sont vitrifiés en utilisant la même méthode que pour les embryons (Reportez-vous au chapitre Vitrification simple d'embryons murins en page 54).

Transplantation

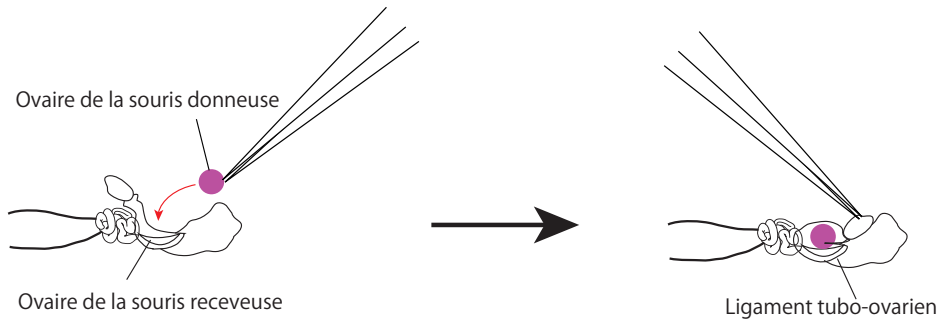
1. Anesthésiez la femelle receveuse.
2. Saisir l'appareil reproducteur (ovaire, oviducte et corne utérine) de manière conventionnelle (Reportez-vous au chapitre Réimplantation d'embryons par l'oviducte en page 67).
3. A l'aide de micro-ciseaux inciser approximativement 1/4 du ligament tubo-ovarien, ainsi qu'une partie de l'amas de graisse adjacent.
4. Retirer 1/2 - 2/3 de l'ovaire avec les micro-ciseaux (à lame courbée).

Remarque

Le fait que les micro-ciseaux soient courbés facilite la mise en place de l'ovaire donneuse.



5. Insérer l'ovaire de la femelle donneuse en lieu et place de l'ovaire retirée et recouvrez-la avec le ligament tubo-ovarien.



[Transplantation d'ovaire de la souris] No. 15-01 

6. Repositionner l'appareil reproducteur dans l'abdomen et refermer l'incision avec des clips de suture.
7. Répéter l'opération pour le second ovaire.
8. Maintenez la température corporelle de la souris (37°C) en la plaçant sur la plaque chauffante jusqu'à ce que les effets de l'anesthésie aient complètement disparu.

Références

1. Migishima F., Suzuki-Migishima R., Song S.Y., Kuramochi T., Azuma S., Nishijima M., and Yokoyama M. 2003. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol. Reprod.* **68**: 881-887.
2. Tsuchiyama S., and Nakagata N. 2009. Cryopreservation of ovaries from elderly female mice. *Exp. Anim.* **58**(3) Suppl: 248.

7-1 Vasectomie pour la stérilisation des males

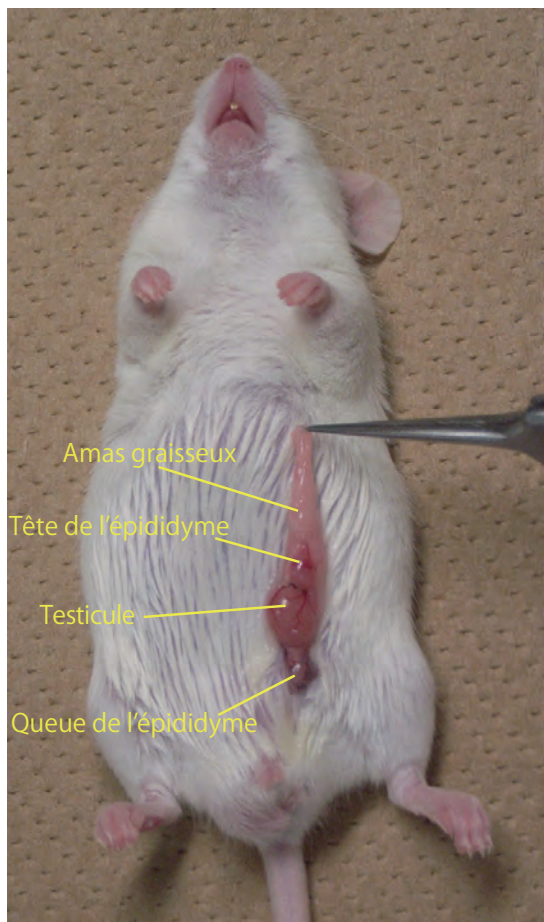
Matériel and Equipement

1. Souris males (âgées de 5 semaines)
2. Anesthésiants
3. Ciseaux de dissection
4. Une paire de forceps watchmaker's #5
5. Agrafes de suture (Autoclip 9mm; Clay Adams 427631) et applicateur d'agrafes (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams 427630)
6. Plaque chauffante (37°C)

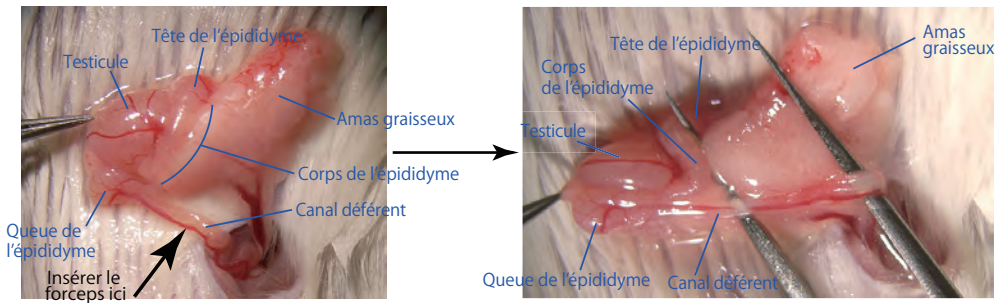
Procédure

Vasectomie

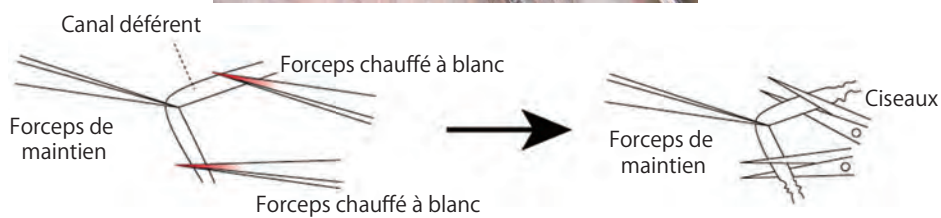
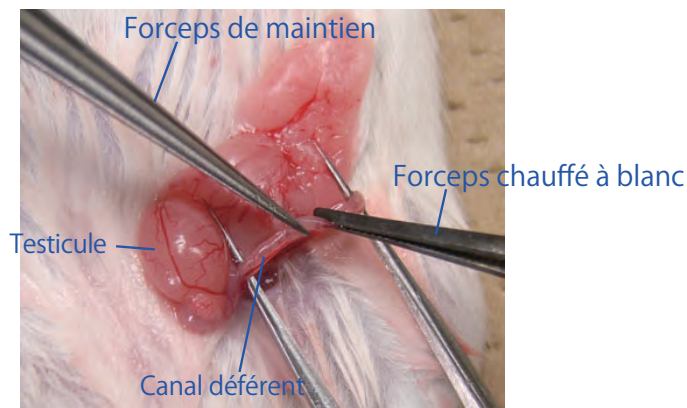
1. Anesthésier une souris male.
2. La procédure traditionnelle commence par une incision débutant au haut de la cuisse (pattes inferieures) et s'étendant sur 1cm environ en direction de la tête de la souris. Une fois l'abdomen incisé, exposez le testicule, l'épididyme, et le canal déférent.



- Attraper le canal déférent avec un forceps et insérer le second forceps sous le canal déférent pour le détacher du tissu conjonctif.



- Maintenez le canal déférent avec un forceps puis cautériser le canal déférent de part et d'autre avec le second forceps chauffé à blanc, comme indiqué sur le schéma ci-dessous.
- Couper la partie du canal déférent située entre les deux zones cautérisées.



- Replacer le testicule, l'épididyme, et le canal déférent dans la cavité abdominale, puis refermer l'incision avec des clips de suture.
- Répéter les étapes 2 à 6 pour le deuxième testicule.

Références

- Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., and Behringer R. 2003. Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (Third edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. ISBN 0-87969-591-9.

Remarque

Une fois la procédure terminée, placer les males individuellement dans les cages. Lorsque les males sont regroupés, ils ont tendance à se battre et peuvent subséquemment décéder. Les males vasectomisés sont prêts à être utilisés dès qu'ils atteignent 8 semaines.

7-2 Réimplantation d'embryons par l'oviducte

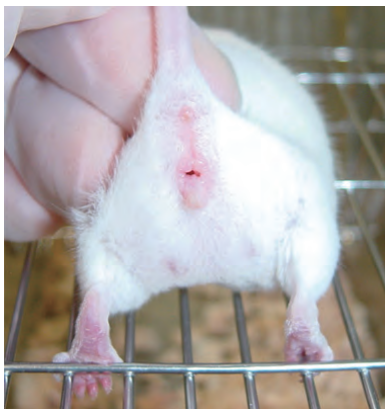
Dans notre laboratoire, nous avons mis au point une technique de réimplantation d'embryons au stade 2 cellules au travers de la paroi de l'oviducte.

Cette procédure est bien plus simple et facile à exécuter que la méthode traditionnelle par l'infundibulum. Cette méthode est donc idéale lorsque le personnel technique ne possède que peu d'expérience.

Matériel and Equipement

1. Souris femelles au premier jour de pseudogestation (avec un bouchon vaginal)

[Apparence du vagin en proestrus]



[Bouchon vaginal]



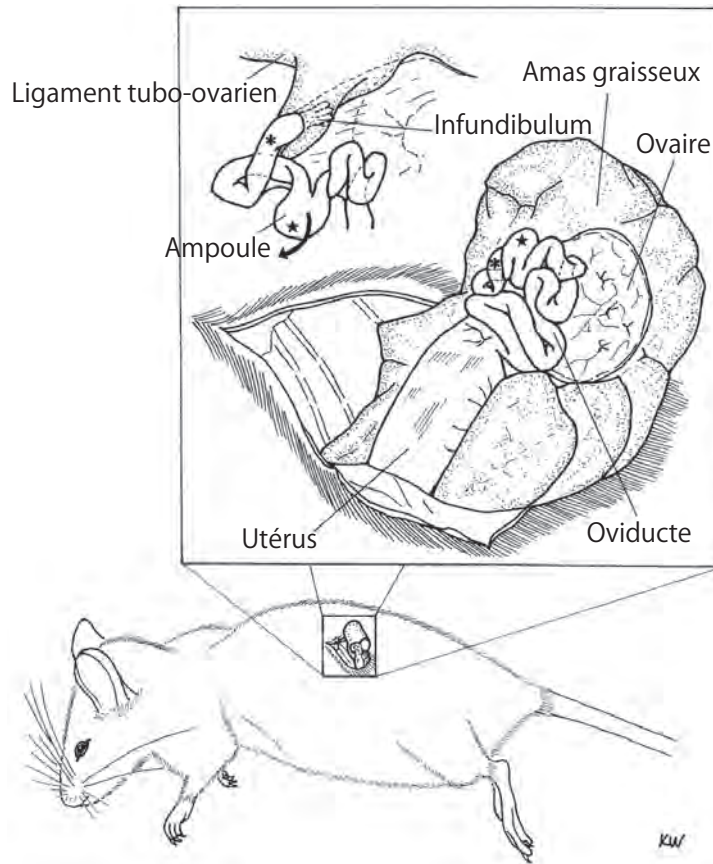
Accoupler avec les
males vasectomisés

2. Anesthésiants
3. Micro-ciseaux à ressorts (lame de 5mm)
4. Une paire de forceps watchmaker's #5
5. Clamp (Serrefine)
6. Agrafes de suture (Autoclip 9mm; Clay Adams 427631) et applicateur d'agrafes (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams 427630)
7. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
8. Capillaires en verre pour manipuler et réimplanter les embryons
9. Plaque chauffante (37°C)

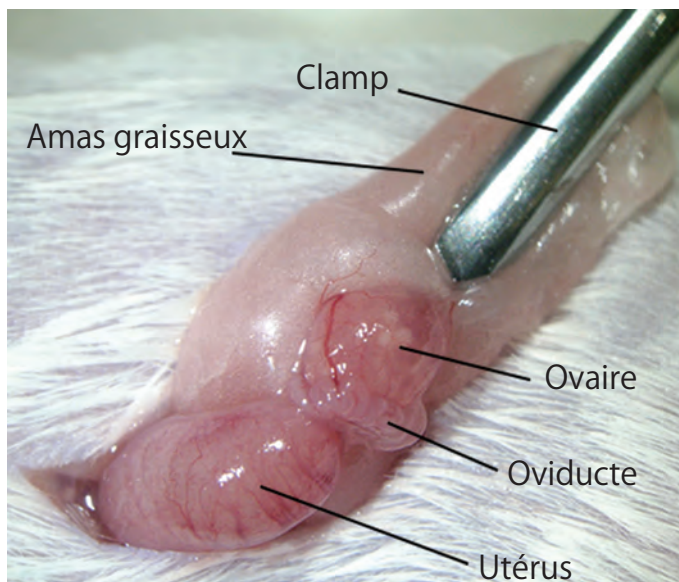
Procédure

Préparation des souris

1. Anesthésier une souris femelle.
2. Disséquer l'appareil reproducteur (ovaire, oviducte et corne utérine).

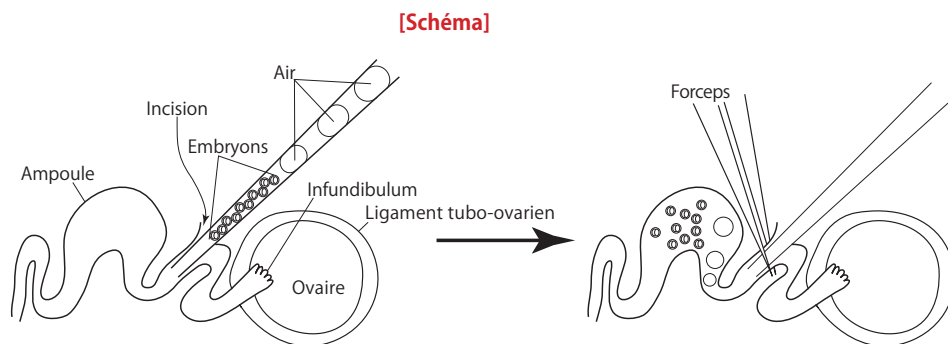


3. Clamper l'amas de graisse attaché au ligament tubo-ovarien.



Positionner l'oviducte

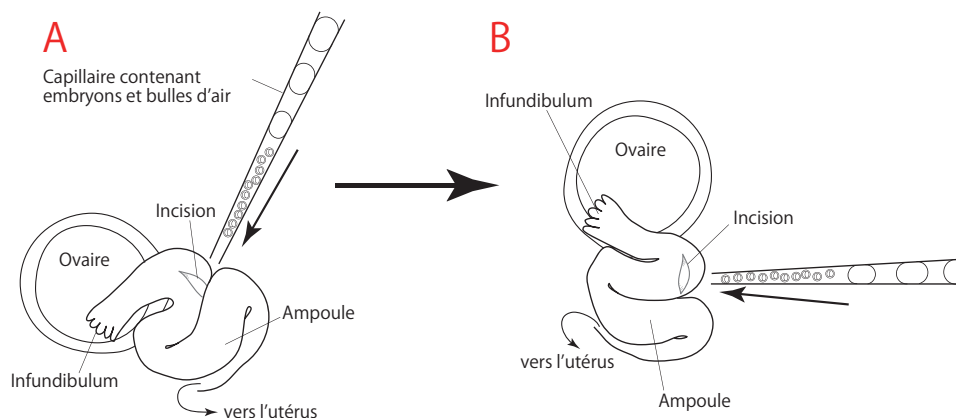
Comme indiqué sur le schéma ci-dessous, la réimplantation par l'oviducte comporte trois étapes : inciser l'oviducte, insérer le capillaire, et décharger les embryons dans l'oviducte en direction de l'ampoule.



Le schéma ci-dessous montrant un oviducte exposé (A) illustre le fait que les oviductes murins sont non seulement petits, mais aussi courbés dans tous les sens.

Ceci rend la réimplantation assez difficile car elle doit se faire en direction de l'ampoule.

Pour faciliter la réimplantation, n'hésitez pas à repositionner le clamp jusqu'à ce que l'ampoule soit bien visible et accessible.



1. Observez l'oviducte au microscope et exposez l'infundibulum et l'ampoule à l'aide des forceps. Replacer le clamp si nécessaire.
2. Placer l'oviducte dans la position la plus accessible en repositionnant entièrement la souris si nécessaire.

Note

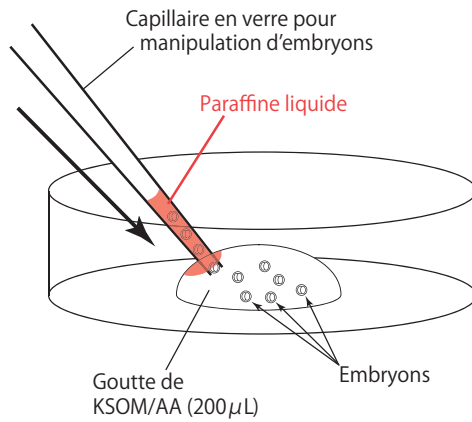
Chaque souris ayant des oviductes avec des replis différents, prenez le temps de bien observer et positionner l'oviducte pour faciliter la réimplantation.

Remarque

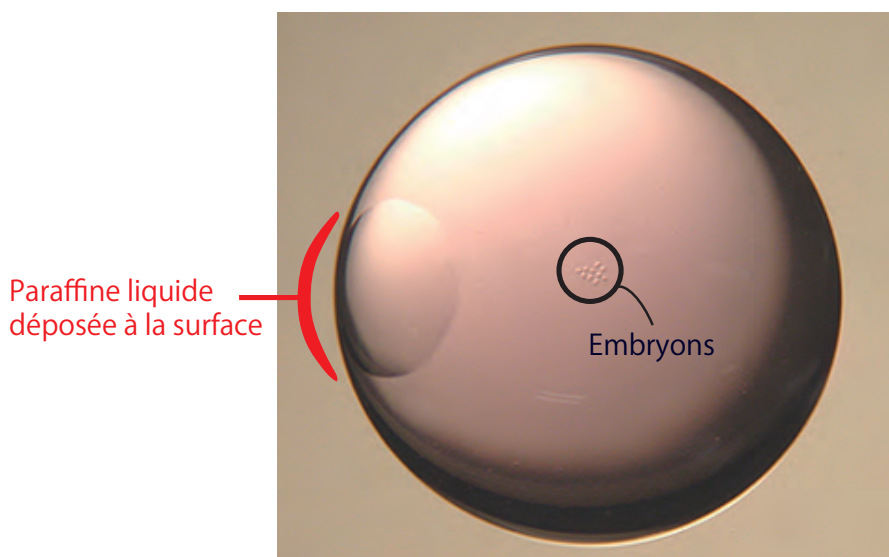
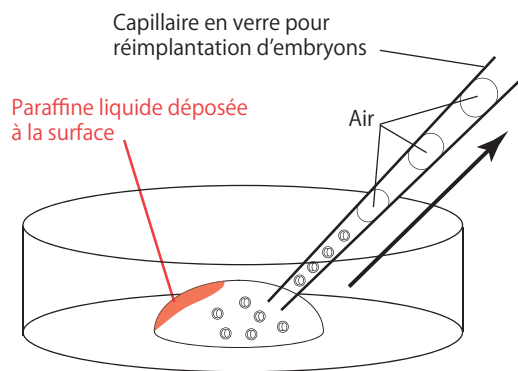
Si vous êtes gaucher, adaptez le positionnement pour une réimplantation du côté gauche.

Préparation des embryons et des capillaires en verre

1. Placer une goutte de 200 μL de KSOM/AA dans une boîte de Pétri (ne pas recouvrir de paraffine liquide) et déposer 20 embryons dans cette goutte.



2. Aspirer alternativement un peu de milieu et d'air pour créer des bulles de 2 à 3 mm dans le capillaire, puis aspirer 10 embryons dans le capillaire.



Remarque

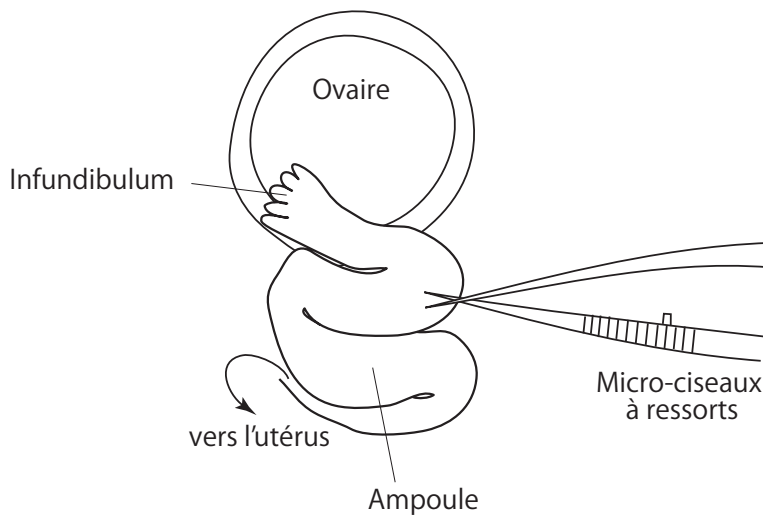
Lorsque le capillaire est inséré dans la goutte pour la première fois, la paraffine liquide se dépose à la surface de la goutte du côté de la pénétration du capillaire.

Aspirez les embryons dans le capillaire par le côté opposé pour éviter la présence de paraffine liquide dans et sur le capillaire.

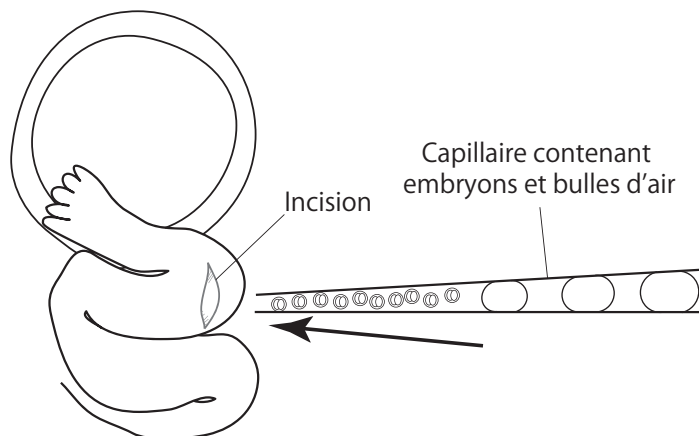
La paraffine liquide est potentiellement néfaste au bon développement des embryons jusqu'à la mise-bas.

Réimplantation

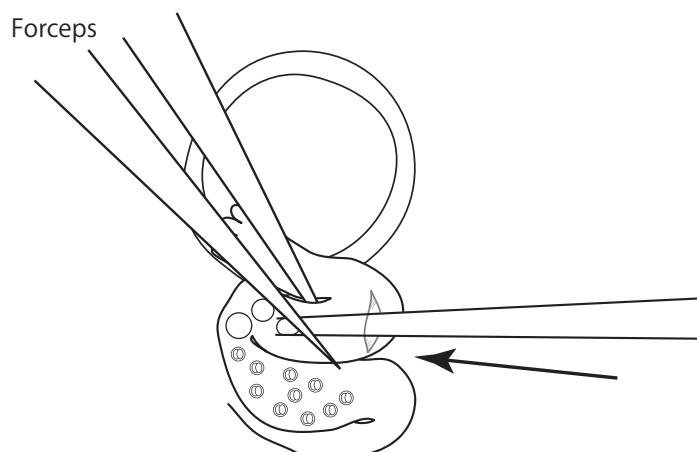
1. Positionnez l'oviducte avec les forceps watchmaker's #5 et faites une petite incision avec les micro-ciseaux dans la paroi de l'oviducte, entre l'infundibulum et l'ampoule.



2. Insérer le bout du capillaire dans l'incision puis enfoncer le capillaire un peu plus profondément en direction de l'ampoule.



3. Maintenez l'oviducte et le capillaire avec un forceps.
4. Décharger les embryons et 2 à 3 bulles d'air dans l'ampoule.



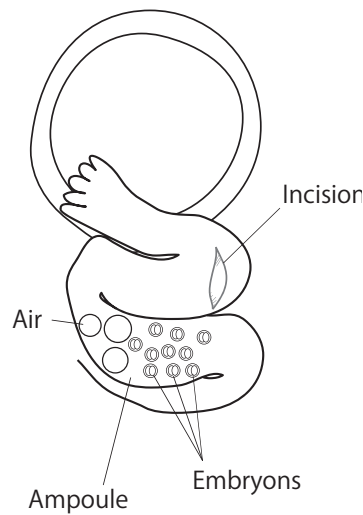
Remarque

Lorsque la réimplantation est opérée correctement, les bulles d'air sont visibles à travers la paroi de l'ampoule.

Note

Si vous ne parvenez pas à expulser les embryons dans l'oviducte, retirer très légèrement le capillaire pour décoller le bout du capillaire de la paroi de l'oviducte et libérer ainsi les embryons.

- Retirer délicatement le capillaire par l'incision.



[Réimplantation d'embryons par l'oviducte] No. 17-01 

- Replacer l'appareil reproducteur (ovaire, oviducte et corne utérine) dans la cavité abdominale et suturer avec des agrafes.



- Répéter l'opération de manière similaire pour réimplanter 10 autres embryons dans le second oviducte.
- Maintenez la température corporelle de la souris (37°C) en la plaçant sur la plaque chauffante jusqu'à ce que les effets de l'anesthésie aient complètement disparu.

Références

- Nakagata N. 1992. Embryo transfer through the wall of the fallopian tube in mice. *Exp. Anim.* 41: 387-388.
- Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., and Behringer R. 2003. Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (Third edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. ISBN 0-87969-591-9.

Note

Ne réimplantez les embryons qu'une fois la position et la direction de l'oviducte ajustées. Lorsque l'oviducte et le capillaire sont placés en parallèle, l'insertion du capillaire est facilitée.

7-3 Réimplantation d'embryons par l'utérus

Matériel and Equipement

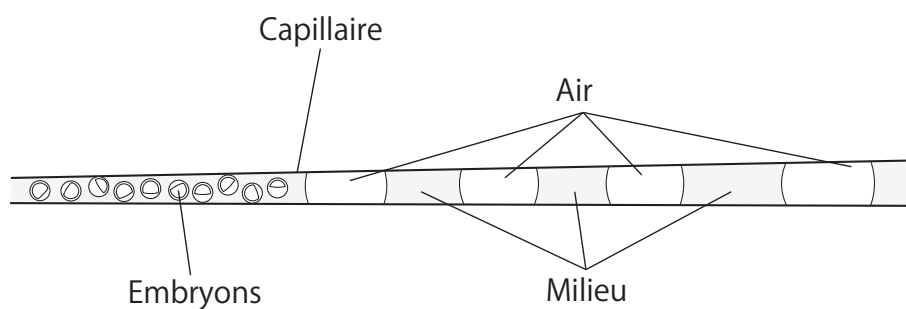
1. Souris femelles au troisième jour de pseudogestation (les femelles sélectionnées ont un bouchon vaginal au premier jour).
2. Anesthésiants
3. Ciseaux de dissection
4. Une paire de forceps watchmaker's #5
5. Clamp (Serrefine)
6. Aiguille de 27 gauges
7. Agrafes de suture (Autoclip 9mm; Clay Adams 427631) et applicateur d'agrafes (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams 427630)
8. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
9. Capillaires en verre pour réimplanter les embryons
10. Plaque chauffante (37°C)

Procédure

Réimplantation

Préparer les souris receveuses, les embryons (du stade 8 cellules au stade blastocyste) et un capillaire en verre en suivant la même méthode que pour la réimplantation par l'oviducte (Reportez-vous au chapitre Réimplantation par l'oviducte en page 67).

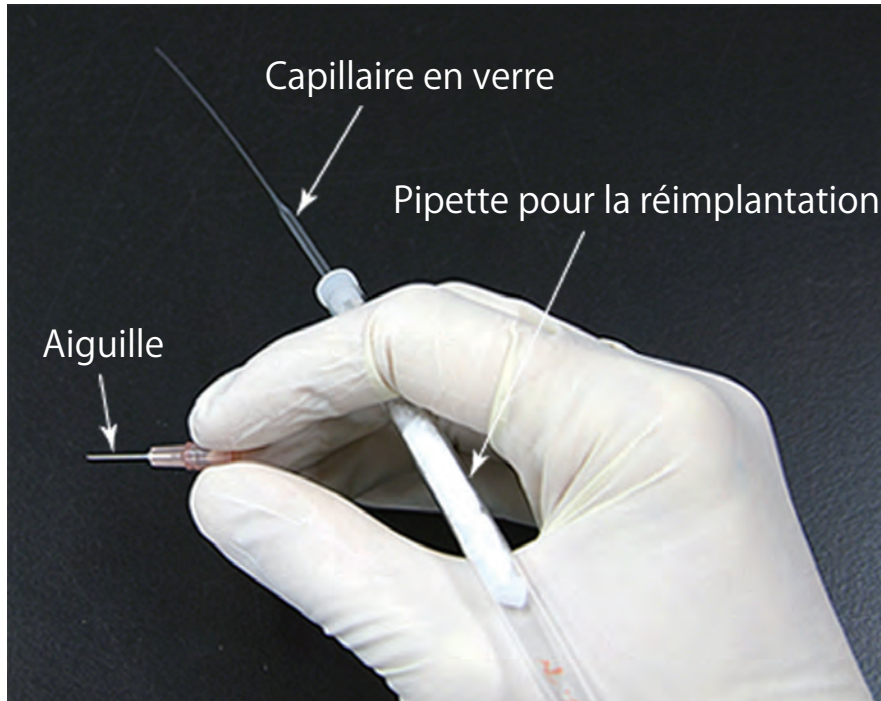
1. Saisir l'appareil reproducteur (ovaire, oviducte, corne utérine) de manière conventionnelle.
2. Clamper l'amas de graisse attaché au ligament tubo-ovarien.
3. Aspirer alternativement un peu de milieu et d'air pour créer des bulles de 2 à 3 mm dans le capillaire, puis aspirer 10 embryons dans le capillaire comme indiqué sur le schéma ci-dessous.



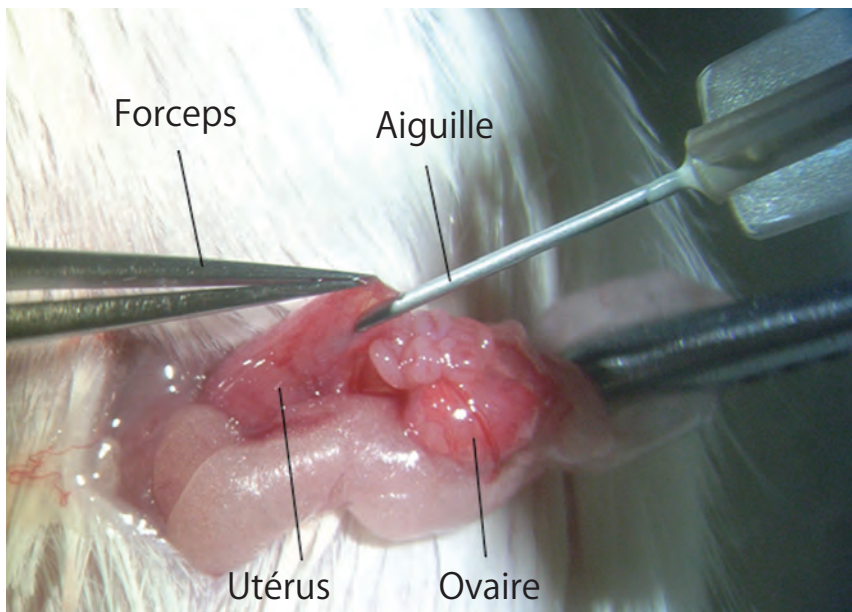
Note

Lors de la préparation des capillaires en verre, évitez de toucher la paraffine liquide.

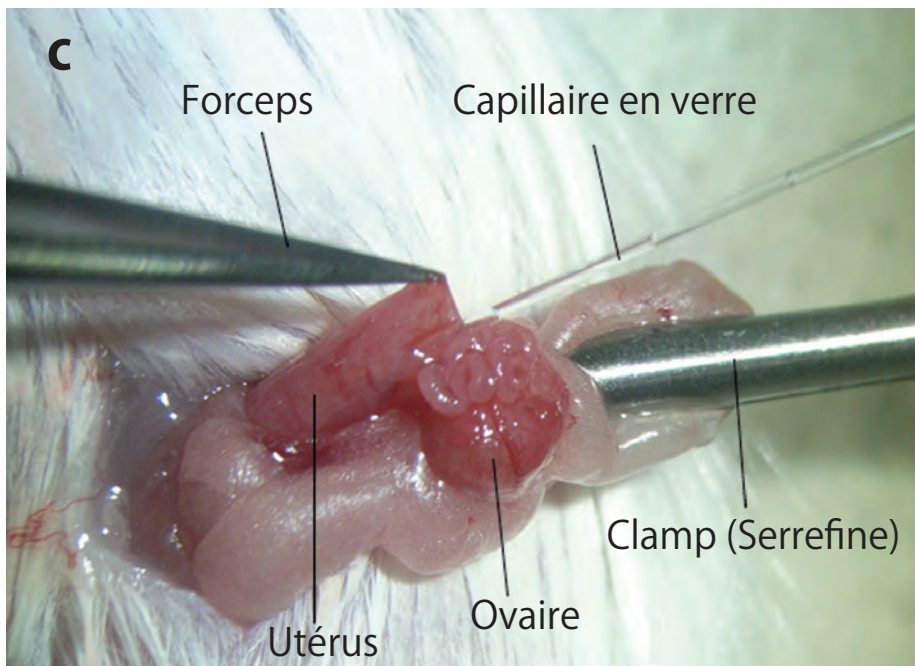
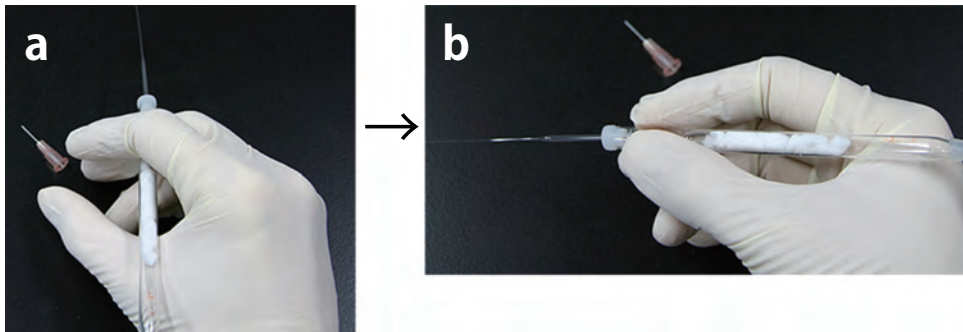
4. Tenez l'aiguille de 27 gauges et le capillaire de réimplantation de la manière illustrée ci-dessous. Observez simultanément le bout du capillaire et l'utérus au microscope, et assurez-vous de placer les deux dans le même plan focal.



5. Maintenez avec précaution la corne utérine à l'aide des forceps, et insérer l'aiguille de 27 gauges dans la paroi de l'utérus jusqu'à pénétration dans la cavité utérine.



6. Retirez l'aiguille et positionnez le capillaire en verre comme indiqué sur les photos a et b. Insérez le bout du capillaire contenant les embryons profondément dans l'utérus en le passant par le trou préalablement percé avec l'aiguille (photo c).



7. Déchargez les embryons dans la cavité utérine ainsi que 2 à 3 bulles d'air.
8. Retirez délicatement le capillaire de l'utérus.

[Réimplantation d'Embryons par l'Utérus] No. 18-01 

[Démonstration de la procédure] No. 18-02 

Note

Tout en maintenant la corne utérine, ne quittez pas des yeux le trou que vous avez fait dans l'utérus jusqu'à ce que la réimplantation soit terminée. Si vous perdez des yeux le trou, il sera difficile de le retrouver.

Note

Si vous ne parvenez pas à expulser les embryons dans l'utérus, retirer très légèrement le capillaire pour décoller le bout du capillaire de la paroi de l'utérus et libérer ainsi les embryons.

Note

Pour vous aider à ne pas perdre le trou des yeux, tenez à la fois l'aiguille et le capillaire en verre avec votre main dominante avant de commencer la procédure.

9. Replacer l'appareil reproducteur (ovaire, oviducte et corne utérine) dans la cavité abdominale et suturer avec des agrafes.



10. Répéter l'opération de manière similaire pour réimplanter 10 autres embryons dans la seconde corne utérine.
11. Maintenez la température corporelle de la souris (37°C) en la plaçant sur la plaque chauffante jusqu'à ce que les effets de l'anesthésie aient complètement disparu.

Références

1. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., and Behringer R. 2003. Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (Third edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. ISBN 0-87969-591-9.

7-4 Césarienne et adoption

Si la femelle porteuse n'a pas mis bas à la date estimée, une césarienne est nécessaire.

Matériel and Equipement

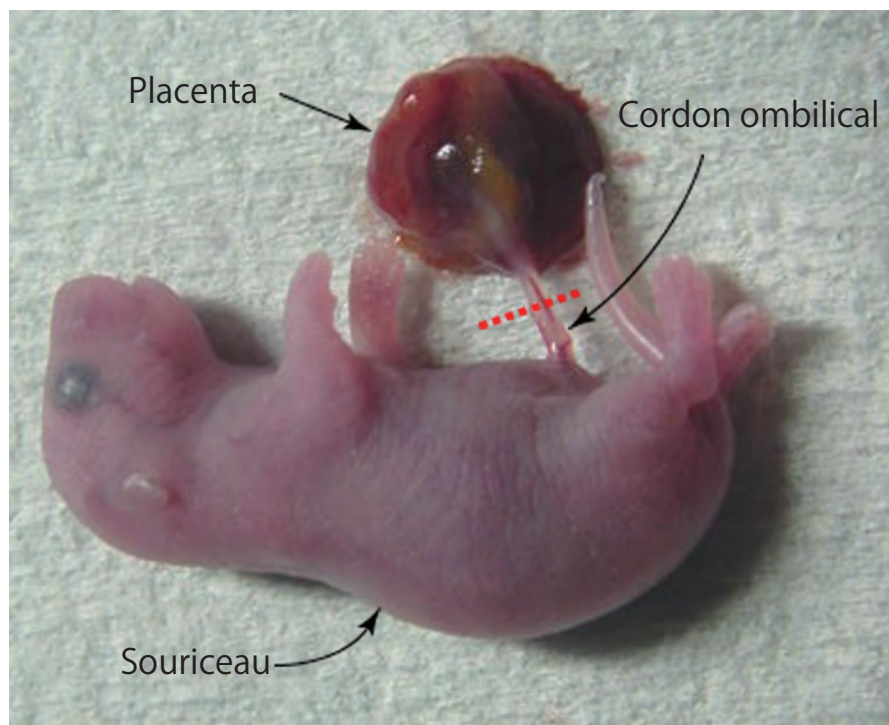
1. Mère adoptive (souris ayant mis bas le même jour ou le jour précédant la date théorique de la mise-bas de la souris enceinte).
2. Ciseaux de dissection
3. Une paire de forceps watchmaker's #5
4. Plaque chauffante (37°C)
5. Souris enceinte (ayant un retard de mise-bas par rapport à sa date théorique).

Procédure

Césarienne

1. Sacrifier la souris enceinte et passer un coton imbibé d'alcool à 70% sur son abdomen.
2. Inciser immédiatement l'abdomen et collecter les utérus contenant les souriceaux avec une paire de ciseaux de dissection.
3. Placer les utérus sur un essuie-tout et inciser la paroi utérine.
4. Retirer rapidement les souriceaux de la membrane vitelline et de l'amnios, puis couper le cordon ombilical de chaque souriceau.

[Disséquer le cordon ombilical]



- Nettoyer le corps des souriceaux avec un essuie-tout pour enlever le liquide amniotique, les sécrétions, et le sang.
- Placer les souriceaux sur la plaque chauffante à 37°C et pincer délicatement les pattes des souriceaux plusieurs fois avec des forceps jusqu'à ce qu'ils commencent à respirer par eux-mêmes et que leur teint devienne rosé.

[De la Dissection des Utérus aux premières respirations des souriceaux]

No. 19-01



Adoption

Sélectionner une mère adoptive dont les souriceaux ont une couleur de pelage différente de celle des souriceaux issus de la césarienne, afin de les différencier plus tard.

- Retirer la mère adoptive de la cage.
- Réduire la portée de moitié (par exemple, si la mère adoptive a 10 souriceaux, retirez-en 4 ou 5).
- Rouler les souriceaux issus de la césarienne dans la litière et mélangez-les avec les autres souriceaux (en essayant de garder le nombre de souriceaux d'origine).
- Replacer la mère adoptive dans la cage.

[Adoption] No. 19-02



Références

- Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., and Behringer R. 2003. Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (Third edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. ISBN 0-87969-591-9.

8-1 Stockage des milieux et solutions dans des ampoules en atmosphère azotée

Matériel and Equipement

1. Appareil de fermeture hermétique à jet double (Adelphi Manufacturing, West Sussex, UK)
2. Ampoule (stérilisée à haute température (180°C, 3 hours))
3. Milieu
4. Seringue avec aiguille de 18 gauges
5. Forceps
6. Azote gazeux

Procédure

Nettoyage et stérilisation des ampoules en verre

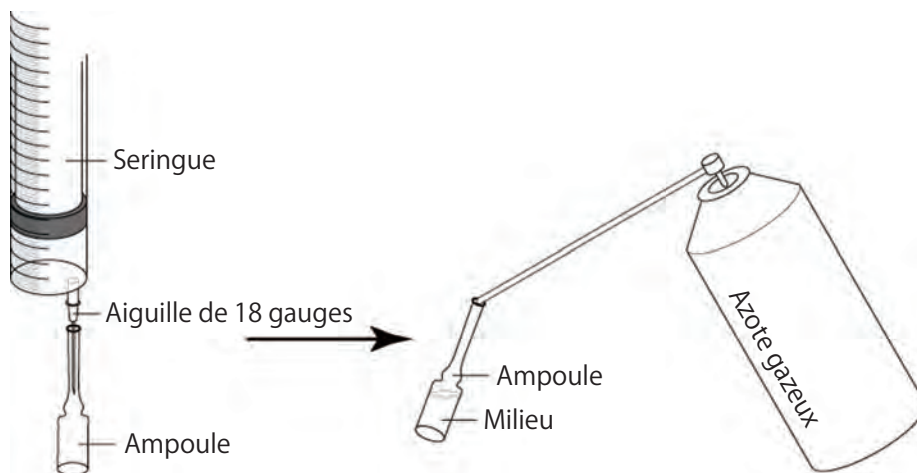
1. Rincer les ampoules en verre à l'eau courante.
2. Rincer les ampoules à l'eau distillée deux fois.
3. Stériliser les ampoules à haute température (180°C pendant 3 heures minimum).

Ignition

1. Ouvrez le robinet de l'appareil de fermeture hermétique à jet double.
2. Ajuster la puissance de la flamme jusqu'à ce qu'elle devienne bleue.

Fermeture hermétique des ampoules

1. Remplir chaque ampoule avec la quantité souhaitée de milieu.
2. Remplir une ampoule d'azote gazeux et immédiatement après fermer hermétiquement l'ampoule avec l'appareil à jet double. Répéter la procédure pour chaque ampoule.



[Remplissage des Ampoules avec du Milieu] No. 20-01



8-2 Tableaux de composition des milieux

mHTF

Composition du mHTF

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	593.8	Sigma	S 5886
KCl	35.0	Sigma	P 5405
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.9	Sigma	M 2773
KH ₂ PO ₄	5.4	Sigma	P 5655
CaCl ₂	57.0	Sigma	C 5670
NaHCO ₃	210.0	Sigma	S 5761
Glucose	50.0	Sigma	G 6152
Na-lactate**	0.34 mL	Sigma	L 7900
Na-Pyruvate	3.7	Sigma	P 4562
Penicillin G	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA (Sérum d'Albumine de Bovin, Fraction V sans acide gras)	400	MERCK/ CALBIOCEM	126575
0.5% phenol red	0.04 mL	Sigma	P 0290

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503

**Solution à 70%

Le mHTF doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

Références

1. Kito S., Hayao T., Noguchi-Kawasaki Y., Ohta Y., Hideki U., and Tateno S. 2004. Improved *in vitro* fertilization and development by use of modified human tubal fluid and applicability of pronucleate embryos for cryopreservation by rapid freezing in inbred mice. *Comp. Med.* 54(5): 564-570.

Hyaluronidase

Composition de la hyaluronidase

Préparer une solution mère à 1% comme indiqué ci-dessous. Stériliser par filtration et congeler (-20 °C) en parties aliquotes de 100 µL. Lors de l'utilisation, diluer la solution mère au dixième. Par exemple, ajouter 20 µL à une goutte (200 µL – volume final) de mHTF contenant les ovocytes pour obtenir une solution finale de 0.1%.

Composé	mg*	Vendeur	Code de référence
Hyaluronidase	10	Sigma	H 3506

*mg/mL diluée dans du mHTF

sucrose 0.3 M (BSA-)**Composition du sucrose 0.3 M (BSA-)**

Composé	mg*	Vendeur	Code de référence
Sucrose	2053.8	Sigma	S 1888

*mg/20 mL de PB1

Composition du PB1 (BSA-)

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503

Le sucrose 0.3 M (BSA-) doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

sucrose 0.3 M (BSA+)**Composition du sucrose 0.3 M (BSA+)**

Composé	mg*	Vendeur	Code de référence
Sucrose	2053.8	Sigma	S 1888

*mg/20 mL de PB1

Composition du PB1 (BSA+)

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503

Le sucrose 0.3 M (BSA+) doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

KSOM/AA**Composition du KSOM/AA**

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	555.0	Sigma	S 5886
KCl	18.5	Sigma	P 5405
KH ₂ PO ₄	4.75	Sigma	P 5655
MgSO ₄ • 7H ₂ O	4.95	Sigma	M 2773
CaCl ₂ • 2H ₂ O	25.0	Sigma	C 7902
NaHCO ₃	210.0	Sigma	S 5761
Glucose	3.6	Sigma	G 6152
Na-Pyruvate	2.2	Sigma	P 4562
DL-Lactic Acid sodium salt	0.174 mL	Sigma	L 1375
10 mM EDTA	100 µL	Sigma	E 6635
Streptomycin	5.0	Sigma	S 9137
Penicillin	6.3	Sigma	P 7794
0.5% phenol red	0.1 mL	Sigma	P 0290
L-Glutamine	14.6	Sigma	G 8540
MEM Essential Amino Acids solution	1.0 mL	GIBCO	11130-051
MEM Non-essential Amino acid solution	0.5 mL	Sigma	M 7145
BSA	100.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503

Le KSOM/AA doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

Références

1. Lawitts J. A., and Biggers J. D. 1993. Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol.* 225:153-164.

sucrose 0.8 M**Composition du sucrose 0.8 M**

Composé	mg*	Vendeur	Code de référence
Sucrose	5476.8	Sigma	S 1888

*mg/20 mL de PB1

Composition du PB1

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503

Le sucrose 0.8 M doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

PB1**Composition du PB1**

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503
Le PB1 doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

DMSO 1 M**Composition du DMSO 1 M**

Composé	mL*	Vendeur	Code de référence
DMSO	1.56	Sigma	D 2650
PB1	18.44	-	-

*Volume final : 20 mL

Composition du PB1

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503

Le DMSO 1M doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

DAP213**Méthode de préparation du DAP213**

1. Les solutions A et B sont préparées et entièrement dissoutes.
2. Un volume égal de chaque solution (A et B) sont ensuite mélangés pour obtenir le DAP213.

Solution A

Composé	mL*	Vendeur	Code de référence
PB1	2.3088	-	-
DMSO	3.1252	Sigma	D 2650
Propylene glycol (PG)	4.556	Sigma	134368

Attention

La solution peut devenir turbide lorsque le DMSO est ajouté.

Solution B

Composé	mg*	Vendeur	Code de référence
Acetamide (AA)	1181.4	Sigma	A 0500

*mg/10 mL de PB1

Composition du PB1

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503

Le DAP213 doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

sucrose 0.25 M**Composition du sucrose 0.25 M**

Composé	mg*	Vendeur	Code de référence
Sucrose	1711.5	Sigma	S 1888

*mg/20 mL de PB1

Composition du PB1

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503

Le sucrose 0.25 M doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.

mWM**Composition du mWM**

Composé	mg/100 mL*	Vendeur	Code de référence
NaCl	640.0	Sigma	S 5886
KCl	35.6	Sigma	P 5405
KH ₂ PO ₄	16.2	Sigma	P 5655
MgSO ₄ • 7H ₂ O	29.4	Sigma	M 7774
NaHCO ₃	190.0	Sigma	S 5761
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Na-Pyruvate	2.5	Sigma	P 4562
Ca-lactate pentahydrate	46.0	Sigma	C 8356
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
Penicillin G	7.5	Sigma	P 7794
0.5% phenol red	0.2 mL	Sigma	P 0290
20 mM 2-ME	10.0 µL	Sigma	M 7522
100 mM EDTA	50.0 µL	Sigma	E 6635
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Dilution dans de l'eau testée sur embryons ; Sigma W1503
Le mWM doit être préservé à 4°C dans des récipients opaques.



Toutes les vidéos incluses dans ce manuel ont été déposées sur une clé USB. Si vous désirez l'obtenir ou pour toute autre question, merci de nous contacter.

Clé USB COSMO BIO



Devant

Derrière

Contact:

Cosmo Bio Co., Ltd.

International Sales Dept.

Toyo-Ekimae Bldg., 2-20, Toyo 2-Chome, Koto-ku, Tokyo 135-0016, Japon

Tel: +81-3-56329617

Fax: +81-3-56329618

Email: export@cosmobio.co.jp

Web: www.cosmobio.com

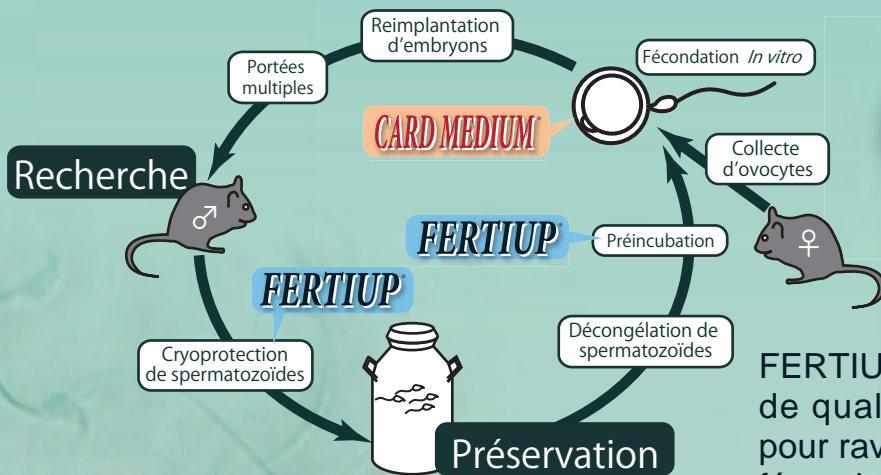
FERTIUP®

Agent Cryoprotecteur et
Milieu de Préincubation

Pour Fécondation
in vitro chez la souris

CARD MEDIUM®

FIV inconsistante ? Utilisez FERTIUP® !!



FERTIUP® MS CPA
KYD-001-EX



FERTIUP® MS PM
KYD-002-EX

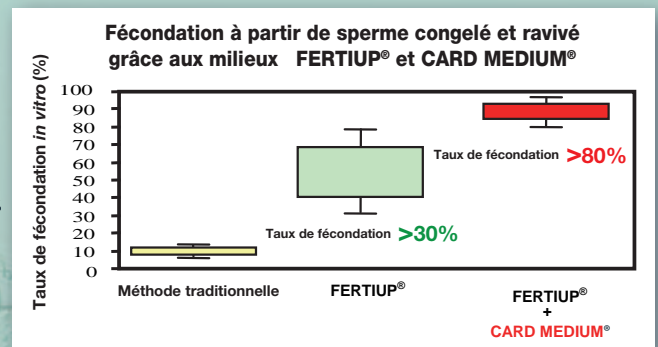


CARD MEDIUM®
KYD-003-EX

FERTIUP® et CARD MEDIUM® sont des milieux de qualité qui améliorent vos performances pour raviver le sperme congelé et effectuer des fécondations in vitro chez la souris.

La combinaison de l'agent Cryoprotecteur de sperme murin FERTIUP®, du milieu de préincubation pour sperme murin FERTIUP®, et du CARD MEDIUM® pour la fécondation in vitro offre les avantages suivants :

- Taux de fécondation dépassant les 80%
- Management amélioré de lignées de souris transgéniques
- Réduction des coûts d'entretien et de reproduction dans les animaleries
- Réduction du temps nécessaire à l'expansion des colonies
- Production améliorée des lignées peu fertiles

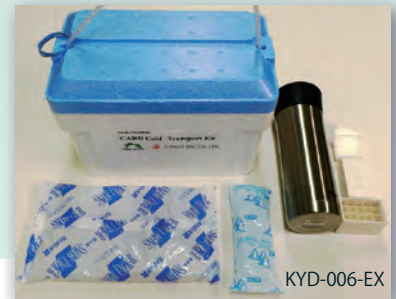


Description	Code de référence	Quantité
FERTIUP® Agent CryoProtecteur : ACP	KYD-001-EX	1 mL
	KYD-001-EX-X5	5 x 1 mL
	KYD-001-05-EX	0.5 mL
	KYD-001-05-EX-X5	5 x 0.5 mL
FERTIUP® Milieu de Préincubation : PM	KYD-002-EX	1 mL
	KYD-002-EX-X5	5 x 1 mL
	KYD-002-05-EX	0.5 mL
	KYD-002-05-EX-X5	5 x 0.5 mL
CARD MEDIUM® Le kit inclut 1 ampoule contenant le milieu (A), 1 flacon avec la poudre (B), un tube en plastique de 1.5 mL (C), un tube en plastique de 1.5 mL (D), une seringue à usage unique de 2.5 mL, 1 aiguille, 1 filtre (taille des pores : 0.22 µm)	KYD-003-EX	1 kit
FERTIUP® PM 1ML & kit CARD MEDIUM® FERTIUP® Milieu de Préincubation pour sperme murin x1 flacon (1 mL) + CARD MEDIUM® x 1 kit	KYD-004-EX	1 set
FERTIUP® PM 0.5ML & kit CARD MEDIUM® FERTIUP® Milieu de Préincubation pour sperme murin x1 flacon (0.5 mL) + CARD MEDIUM® x 1 kit	KYD-005-EX	1 set

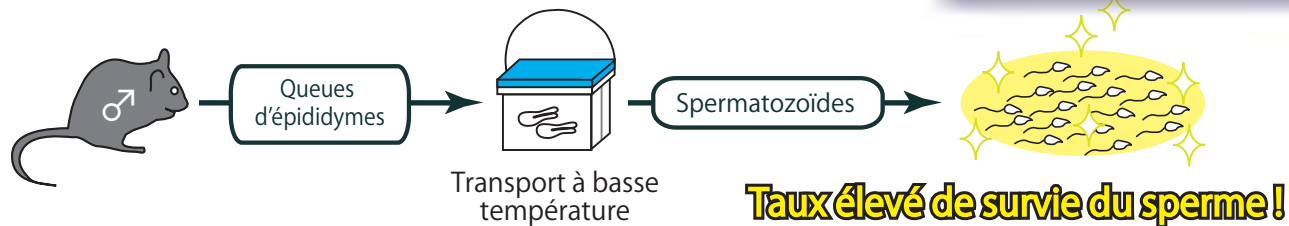
KIT DE TRANSPORT A BASSE TEMPERATURE CARD

Spécialement étudié pour le transport à bas prix et sécurisé de queues d'épididymes et embryons à basse température.

- Réduit les coûts de transport de souris vivantes
- Elimine les risques de décès ou d'évasions durant le transport
- Préviend la transmission de pathogènes
- Essentiel pour la méthode de ressuscitation de lignées par fécondation in vitro avec spermatozoïdes congelés



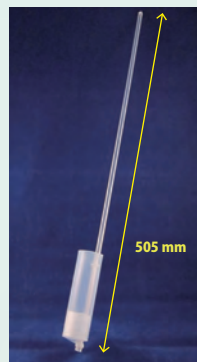
KYD-006-EX



Description	Code de référence	Quantité
Kit de transport à basse température CARD	KYD-006-EX	1 set
1 boîte de transport en polystyrène, blocs réfrigérants (4 larges, 2 petits), 1 Thermos, 1 boîte en papier, matériel anti-choc (coton)		

FERTIUP® et CARD MEDIUM produits complémentaires

Description	Code de référence	Quantité
Paillettes pour Sperme (10 Pièces x 10 Unités)	KYD-S020X10	10 pc
Gobelet pour la congélation	KYD-S018	1 unité
Connecteur pour Paillettes (5 parties incluses)	KYD-S025	1PC
Cassette Triangulaire Courte (10 unités)	KYD-S021	10 unités
Cassette Triangulaire Longue (10 unités)	KYD-S035	10 unités
Kit pour la Manipulation d'Embryons	KYD-S036	1 set
Capillaire en Verre 20PC	KYD-S037	1 set
Bec Benzène automatique APT-3	PHD-APT3-EX	10 unités

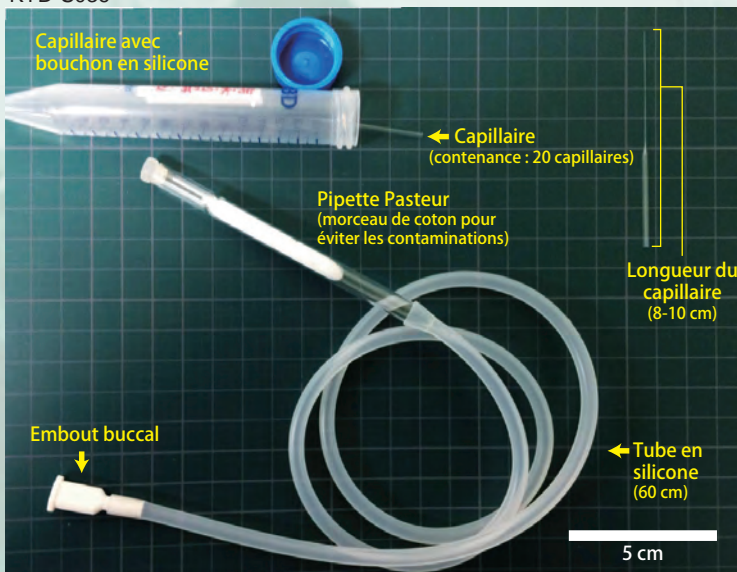


Gobelet pour la congélation
KYD-S018



Connecteur pour Paillettes
KYD-S025

Kit pour la Manipulation d'Embryons
KYD-S036



Cassette Triangulaire Longue
KYD-S035



Cassette Triangulaire Courte
KYD-S021



Bec Benzène automatique APT-3
PHD-APT3-EX

Paillettes pour Sperme
KYD-S020X10



COSMO BIO CO., LTD.

Cherchez!

fertiup



CARD HyperOva[®]

Agent Amélioré de Superovulation pour la Souris



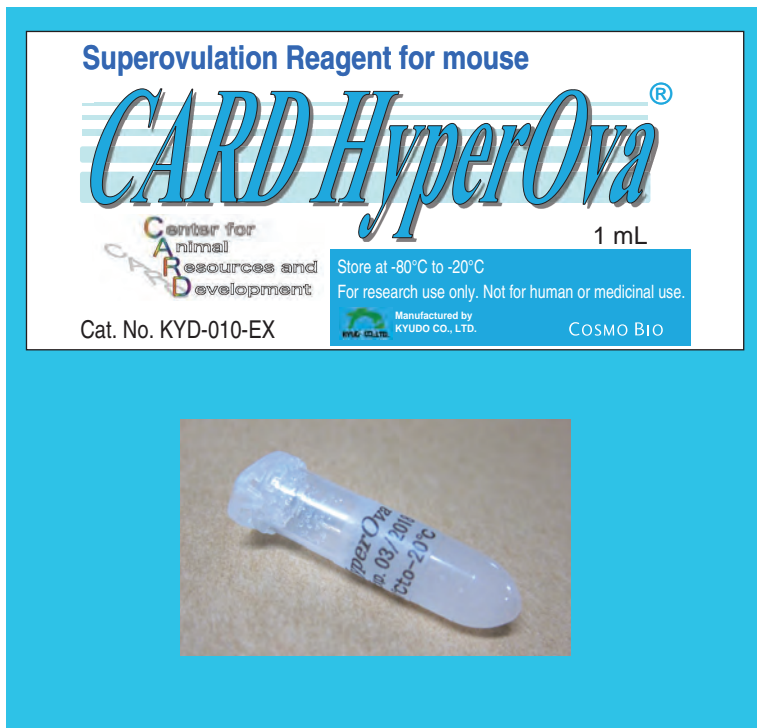
Souriceaux obtenus par FIV à partir **d'UNE SEULE** femelle C57BL/6J ayant été superovulée avec CARD HyperOva[®]

Excellent pour la FIV.

Choisissez HyperOva[®] pour obtenir plus d'ovocytes ovulés.

Center for
Animal
Resources and
Development

- Environ 100 ovocytes peuvent être collectés à partir d'une seule souris C57BL/6J
- Optimisez votre FIV en utilisant HyperOva[®] en combinaison avec l'agent Cryoprotecteur de sperme murin FERTIUP[®], le milieu de préincubation pour sperme murin FERTIUP[®], et le CARD MEDIUM[®] pour la fécondation in vitro chez la souris.



Composition:

Un mélange optimisé d'anticorps anti-inhibine et de gonadotrophine chorionique purifiée de jument (eCG)

Procédure pour la Superovulation:

1. Injectez (i.p.) une souris femelle âgée de 26 à 30 jours avec 0.1 à 0.2 mL de CARD HyperOva®. Les injections se font en général de jour, entre 17h00 and 18h00.
2. Injectez (i.p.) la même souris 48h plus tard avec 7.5 UI de gonadotrophine chorionique humaine (hCG) (non-inclue).

Références:

1. Takeo T., Nakagata N. 2015. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice. *PLoS ONE* **10**(5): e0128330. doi:10.1371/journal.pone.0128330
2. Takeo T., Nakagata N. 2016. Immunotherapy using inhibin antiserum enhanced the efficacy of equine chorionic gonadotropin on superovulation in major inbred and outbred mice strains. *Theriogenol.* doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.076

Description	Code de référence	Quantité	Conservation
CARD HyperOva®	KYD-010-EX	1 mL	-20°C
	KYD-010-EX-X5	5x 1 mL	-20°C
	KYD-010-06-EX	0.6 mL	-20°C
	KYD-010-06-EX-X5	5x 0.6 mL	-20°C

Transport : Glace carbonique

Vitrification/Décongélation/liquides et Milieux

Pour la Souris, le Rat

et la Manipulation d'Embryons

Souris

Description	Application	Code de référence	Quantité	Conservation
HTF	Fécondation <i>in vitro</i>	CSR-R-B071	5 mL x 10 flacons	4°C
HTF	Fécondation <i>in vitro</i>	CSR-R-B070	2 mL x 10 flacons	4°C
mHTF	Fécondation <i>in vitro</i>	KYD-008-02-EX	2 mL x 1 flacons	4°C
mHTF	Fécondation <i>in vitro</i>	KYD-008-02-EX-X5	2 mL x 10 flacons	4°C
mHTF	Fécondation <i>in vitro</i>	KYD-008-05-EX	5 mL x 1 flacons	4°C
mHTF	Fécondation <i>in vitro</i>	KYD-008-05-EX-X3	5 mL x 10 flacons	4°C
KSOM	Culture <i>in vitro</i>	CSR-R-B075	5 mL x 10 flacons	4°C
KSOM	Culture <i>in vitro</i>	CSR-R-B074	2 mL x 10 flacons	4°C
mWM	Culture <i>in vitro</i>	CSR-R-B081	5 mL x 10 flacons	4°C
mWM	Culture <i>in vitro</i>	CSR-R-B080	2 mL x 10 flacons	4°C
sucrose 0.25M	Congélation/décongélation	CSR-R-Y078	5 mL x 10 flacons	4°C
sucrose 0.25M	Congélation/décongélation	CSR-R-Y077	2 mL x 10 flacons	4°C
DMSO 1M	Cryopréservation	CSR-R-T072	2 mL x 10 flacons	4°C
DAP213	Cryopréservation	CSR-R-T073	1 mL x 10 flacons	4°C

Rat

Description	Application	Code de référence	Quantité	Conservation
mR1ECM	Culture <i>in vitro</i>	CSR-R-M174	5 mL x 10 flacons	4°C
mR1ECM	Culture <i>in vitro</i>	CSR-R-M191	2 mL x 10 flacons	4°C

Manipulation d'Embryons

Description	Application	Code de référence	Quantité	Conservation
M2	Manipulation <i>in vitro</i>	CSR-R-M084	5 mL x 10 flacons	4°C
M2	Manipulation <i>in vitro</i>	CSR-R-M083	2 mL x 10 flacons	4°C
PB1	Manipulation <i>in vitro</i>	CSR-R-P183	5 mL x 10 flacons	4°C
PB1	Manipulation <i>in vitro</i>	CSR-R-P185	2 mL x 10 flacons	4°C
PEPeS	Cryopréservation	CSR-R-P187	1 mL x 10 flacons	4°C
P10	Cryopréservation	CSR-R-P186	2 mL x 10 flacons	4°C



Techniques d'ingénierie reproductive de la **Souris**

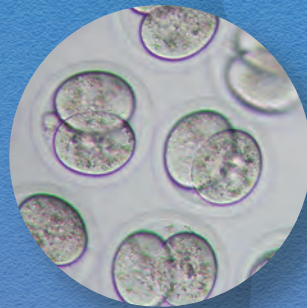
Manuel Technique

Naomi Nakagata

Division d'ingénierie reproductive
Centre de Ressources Animales et de Développement (CARD)
Université de Kumamoto, Japon

Version française

Fabien Delerue



COSMO BIO Co., LTD.

TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,
KOTO-KU, TOKYO 135-0016, JAPAN
TEL : (81)3-5632-9617
FAX : (81)3-5632-9618
e-mail : export@cosmobio.co.jp
URL : www.cosmobio.com

