

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

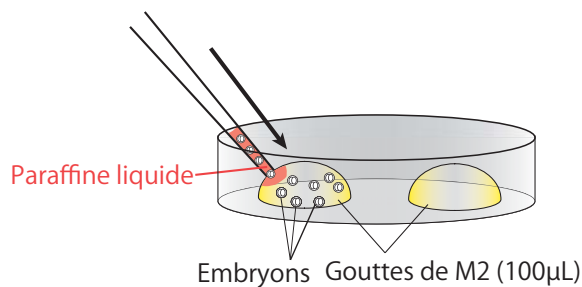
### Matériel and Equipement

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)

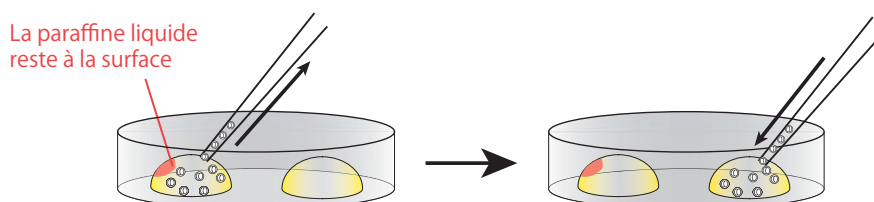
### Procédure

#### Stockage réfrigéré d'embryons au stade 2 cellules

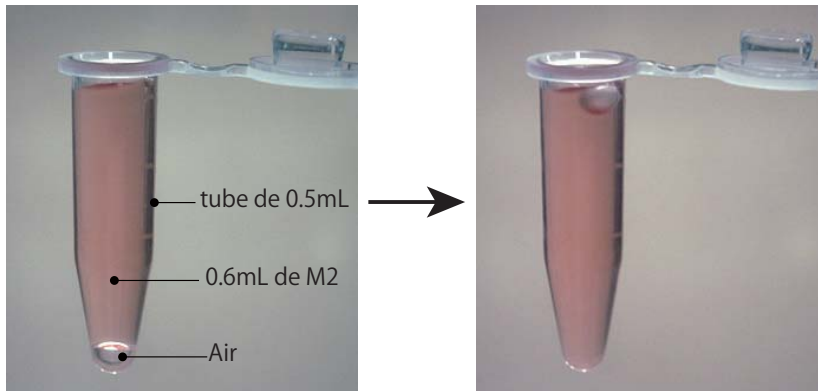
1. Placer deux gouttes de 100  $\mu$ L de M2 dans une boîte de Pétri.
2. Transférer les embryons au stade 2 cellules du milieu de culture à la goutte de M2.



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.



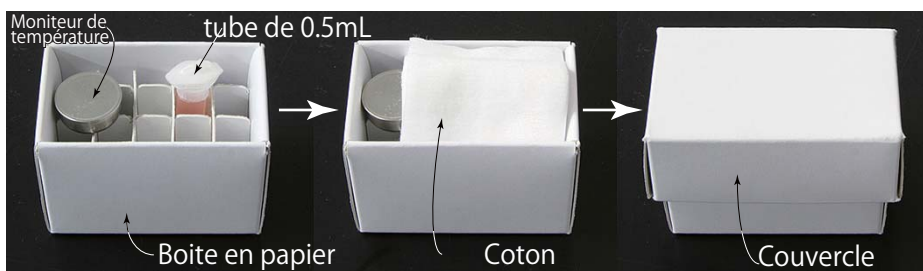
- Remplissez un tube de 0.5 mL avec 0.6 mL de M2 à température ambiante. Si vous observez la présence de bulles au fond du tube, tapoter le tube pour évacuer les bulles.



- 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

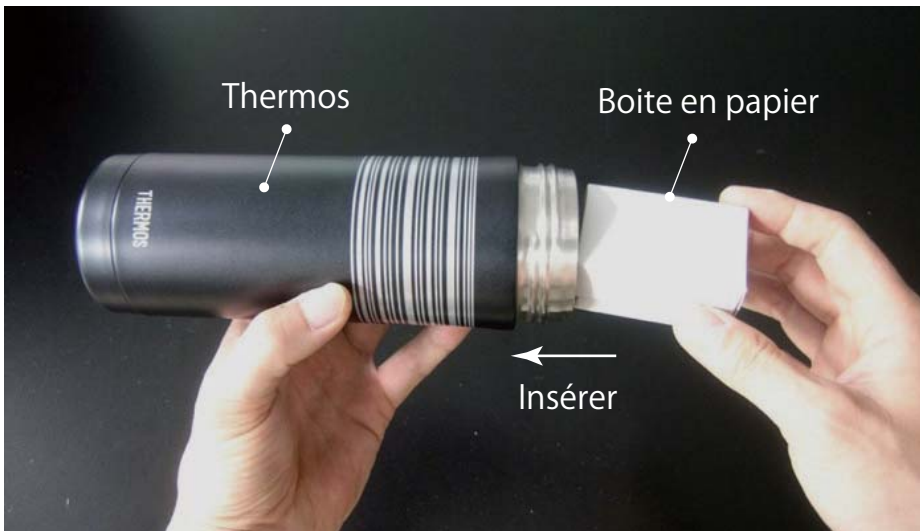
Les embryons maintiennent leurs capacités développementales pendant 72 heures.

**Emballage et transport d'embryons au stade 2 cellules**

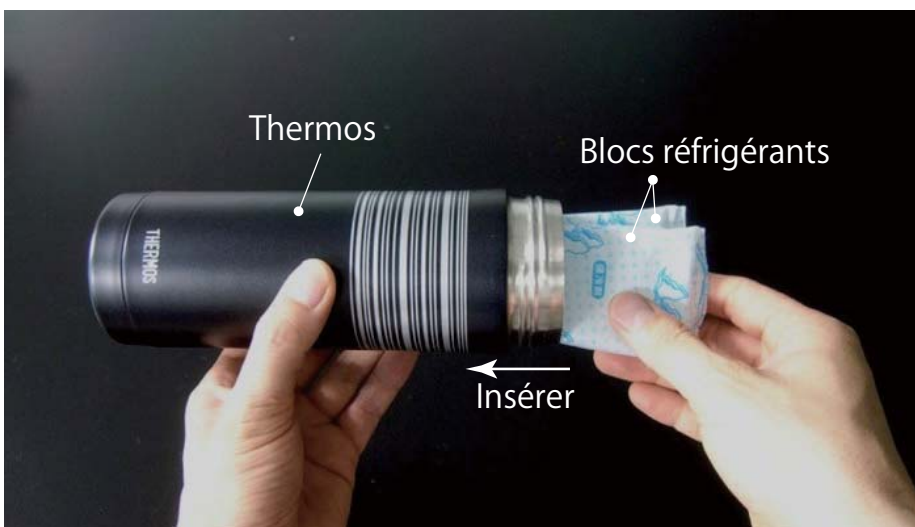
Préparez une boîte en papier contenant les embryons au stade 2 cellules comme détaillé précédemment (Stockage réfrigéré d'embryons au stade 2 cellules).

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.



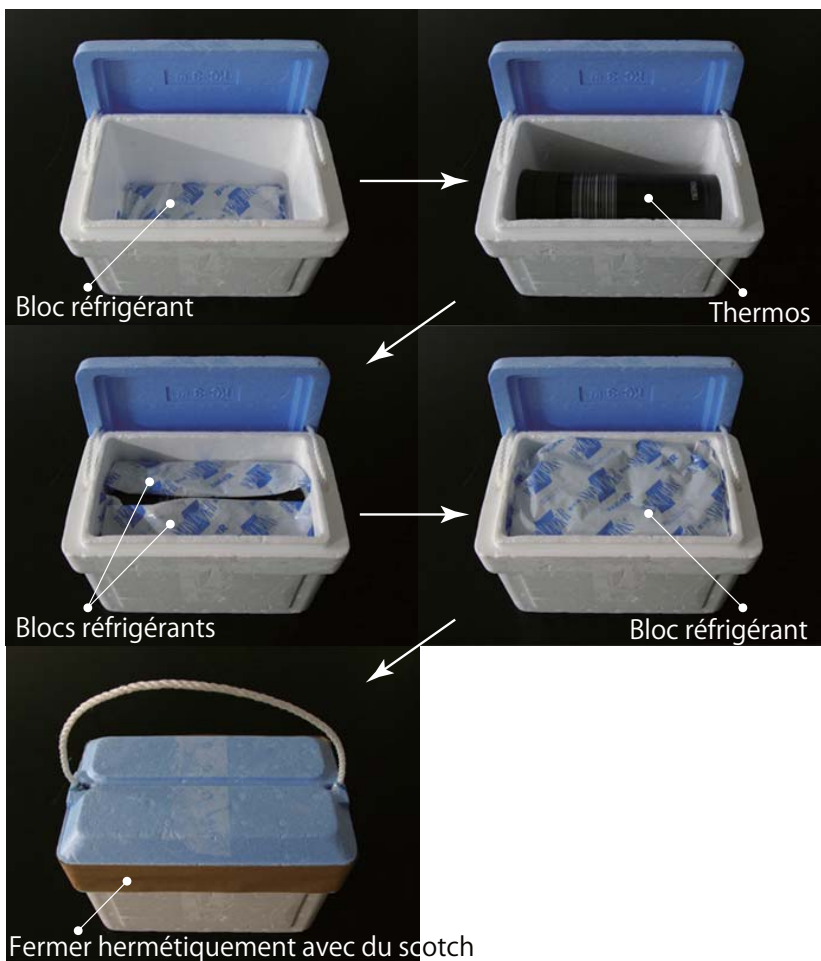
2. Insérer deux petits blocs réfrigérants dans le thermos.



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

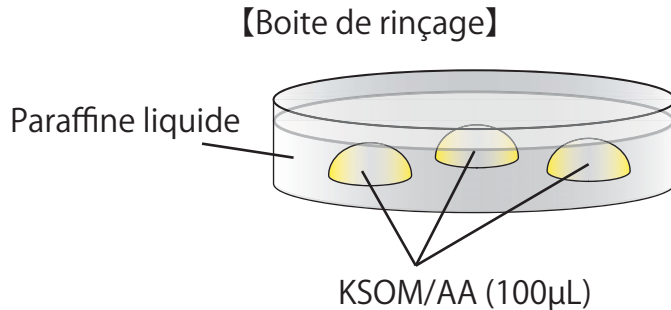
Prenez soin de ne pas retourner la boîte en papier.

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.**

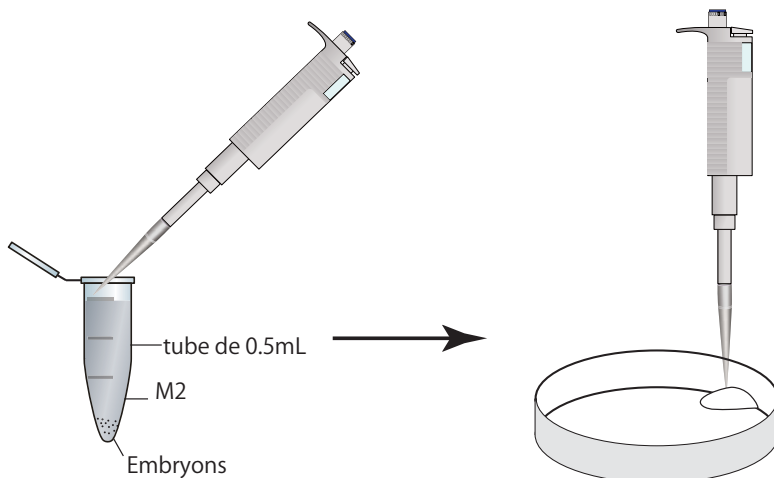
1. Placer 3 gouttes (100  $\mu\text{L}$  / goutte) de KSOM/AA dans une boîte de Pétri et recouvrir avec de la paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ) au minimum 30 minutes.



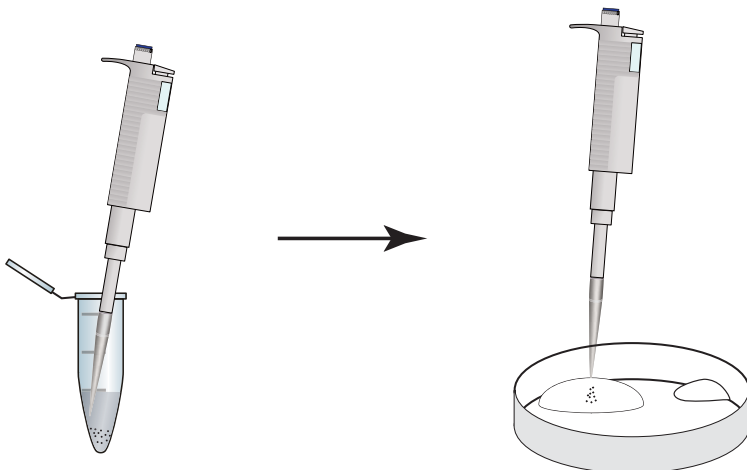
2. Sortir la boîte en papier contenant les échantillons du thermos.
3. Laisser la boîte en papier à température ambiante pendant 30 minutes.

**[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  $\mu\text{L}$  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.

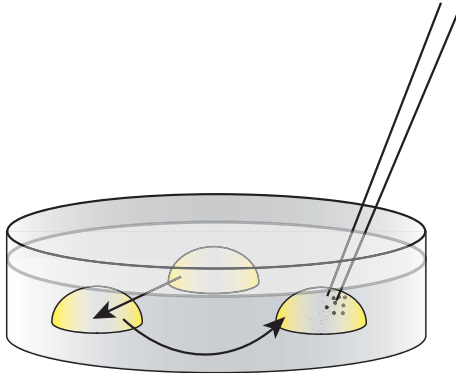
**Remarque**

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  $\mu$ 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  $\mu$ 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)

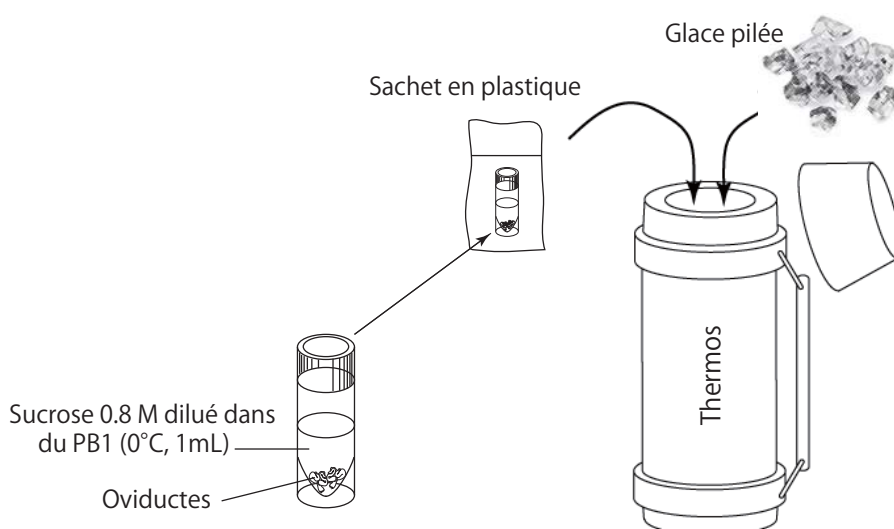
### Procédure

#### 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

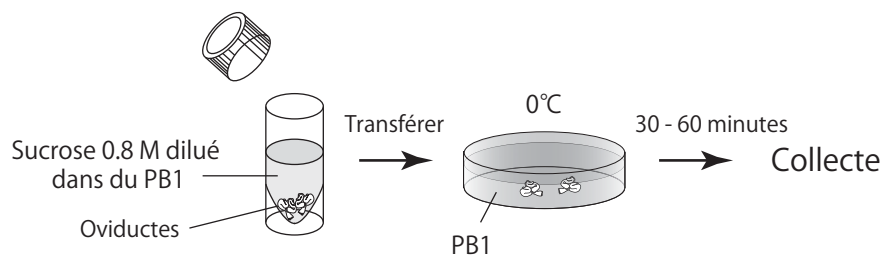
1. Transférer les oviductes dans un cryotube contenant 1 mL de sucrose 0.8 M (0°C).
2. Placer le tube dans un sachet en plastique et fermer hermétiquement.
3. Placer le sachet en plastique dans le thermos contenant la glace pilée et expédier le tout par service postal.





## 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 dégénèrent 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 dégénèrent.

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

(Reportez-vous au chapitre Vitrification 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  $\mu\text{m}$  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

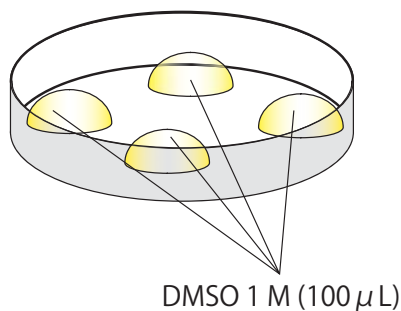
### Procédure

#### 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  $-20^{\circ}\text{C}$ .
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  $0^{\circ}\text{C}$ .

#### Vitrification

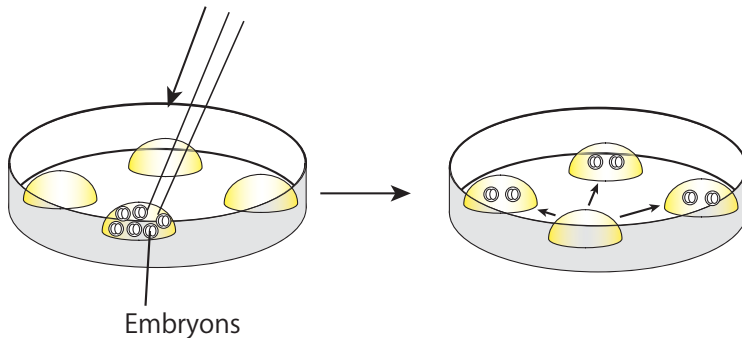
1. Filtrer le DMSO 1 M et disposez 4 gouttes ( $\sim 100 \mu\text{L}$  / goutte) dans une boîte de Pétri. La première goutte sert à rincer les embryons, alors que les autres gouttes servent à contenir les embryons préalablement rincés.



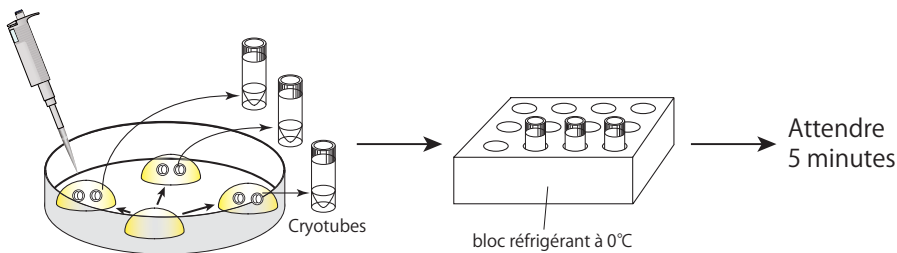
#### Remarque

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

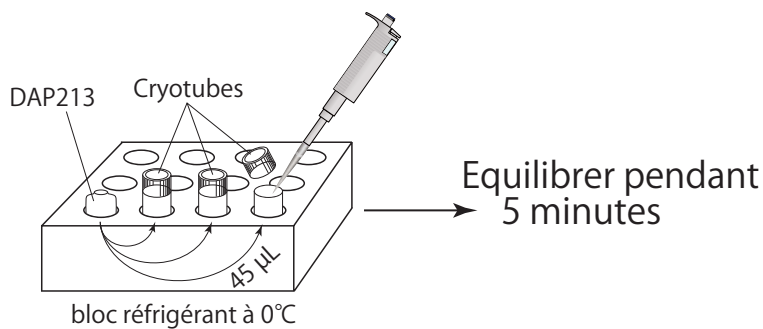
- Déposer les embryons dans la première goutte pour les rincer du milieu de collection. Diviser le total en lots égaux et transférer les embryons dans les gouttes respectives. Par exemple, si vous disposez de 120 embryons dans la goutte de rinçage, séparez-les en groupes de 40 dans les trois autres gouttes.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



- Monter un embout pour dépôt sur gel sur une pipette de 20  $\mu\text{L}$  et pipeter les embryons dans un volume total de 5  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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).

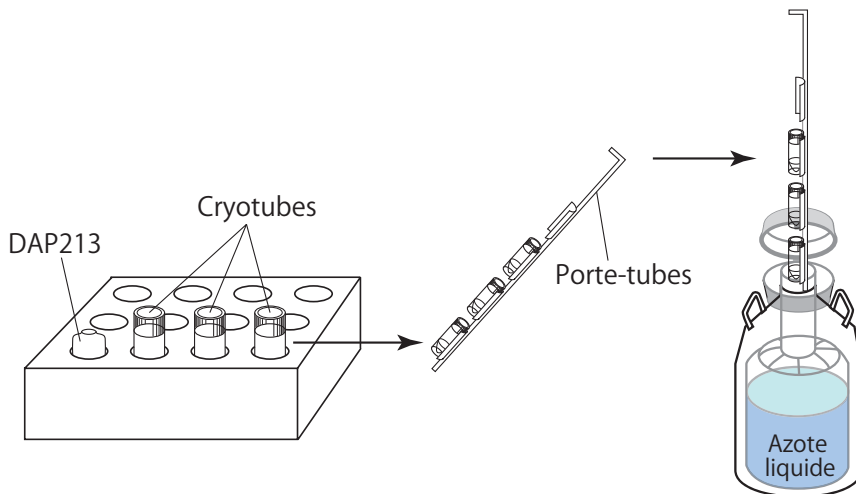
### Note

Il est recommandé de regrouper les embryons au centre de la goutte pour faciliter le pipetage dans un volume limité à 5  $\mu\text{L}$  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.

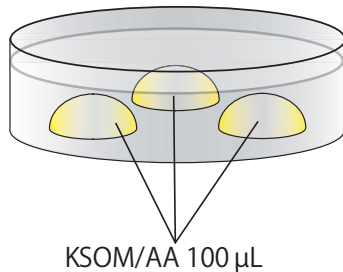


**[Vitrification des Embryons]** No. 13-01 

### Préparation pour la décongélation

- Placer 3 gouttes (100  $\mu$ 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% CO<sub>2</sub>) au minimum 30 minutes.

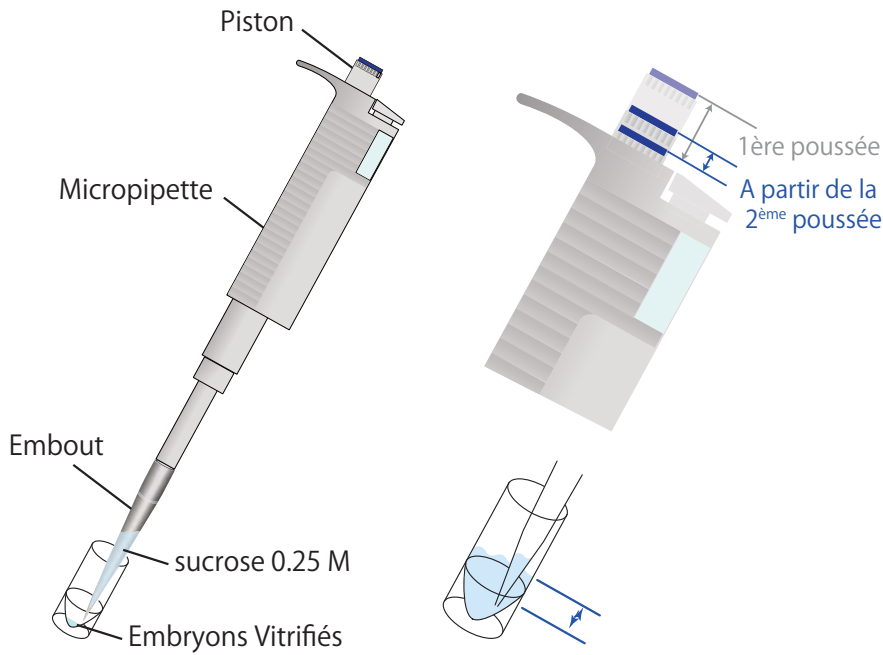
#### 【Boîte de rinçage】



- Préchauffer la solution de sucrose 0.25 M dans l'étuve (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 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 sucrose 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.

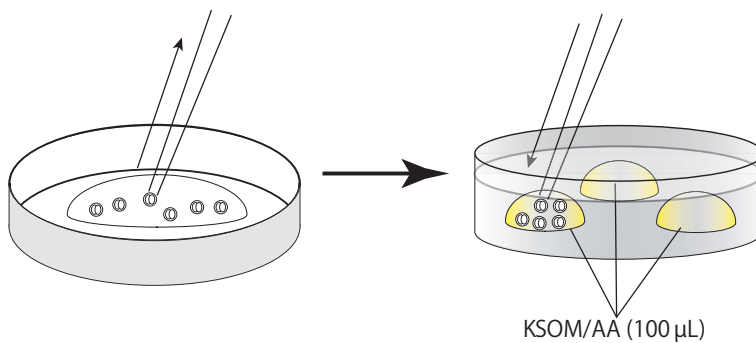
**[Raviver les Embryons Vitrififiés]**

No. 13-02 

**[Pipetage pour Raviver les Embryons Vitrififiés]**

No. 13-03 

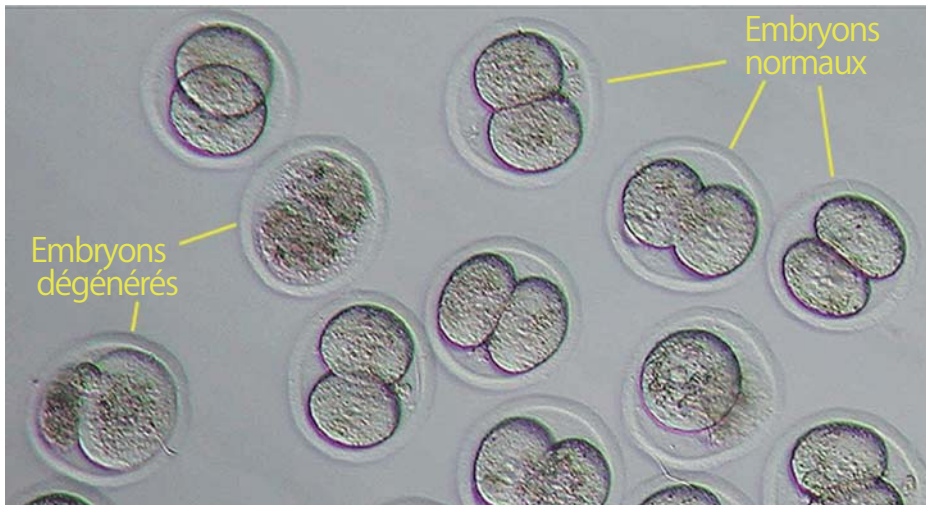
- Aspirer les embryons et transférer-les dans une goutte de KSOM/AA (boîte de rinçage) puis placer la boîte dans l'étuve (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).



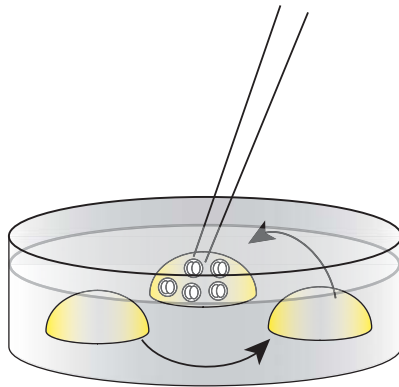
### Note

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

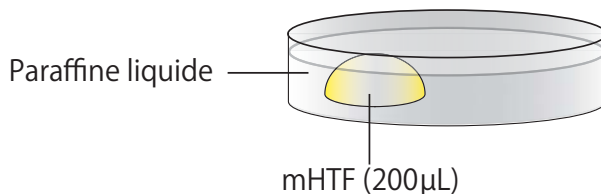
1. Souris femelles superovulées avec PMSG et hCG
2. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)
3. Paraffine liquide
4. Micropipette
5. Embouts de pipettes
6. mHTF
7. Hyaluronidase (1%) diluée dans du mHTF
8. Sérum fœtal de bœuf (FBS Cat. No. 26140-087; Gibco)
9. Microfiltre (Millex-GV 0.22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

### Procédure

#### Préparation des boîtes de Pétri

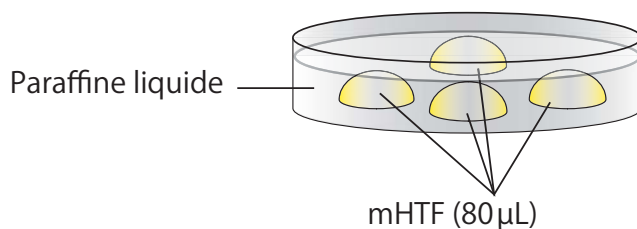
1. Placer 1 goutte de 200  $\mu\text{L}$  de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrez-la de paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) au minimum 30 minutes.

#### 【Boite contenant les Ovocytes】



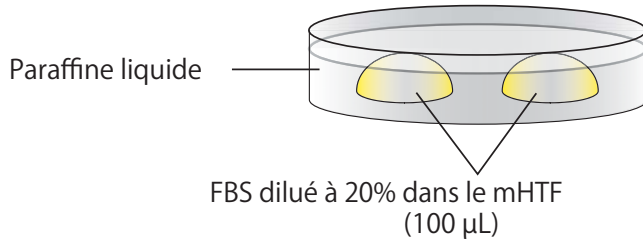
2. Placer 4 gouttes (80  $\mu\text{L}$ /goutte) de mHTF dans une boîte de Pétri et recouvrez-les de paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) au minimum 30 minutes.

#### 【Boite de rinçage】



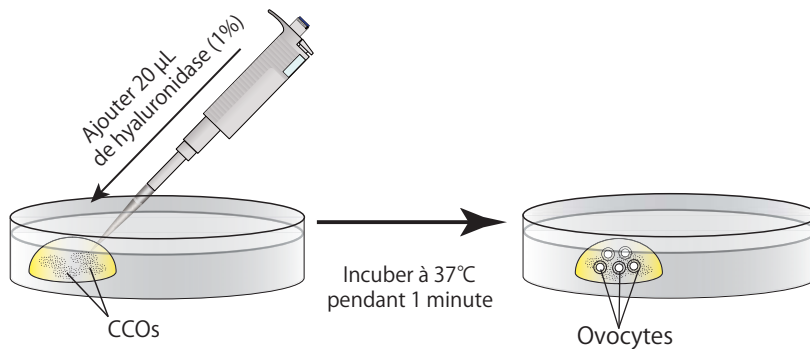
- Diluer le sérum fœtal de bœuf (FBS) à 20% dans le mHTF et stérilisez par filtration. Placer 2 gouttes (100  $\mu\text{L}$  /goutte) de ce milieu dans une boîte de Pétri et recouvrez-les de paraffine liquide. Placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ) au minimum 30 minutes.

## 【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  $\mu\text{L}$  de mHTF (boîte contenant les ovocytes).
- Ajouter 20  $\mu\text{L}$  de hyaluronidase (1%) à la goutte de mHTF contenant les CCOs et placer la boîte de Pétri dans l'étuve (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ) pendant 1 minute.

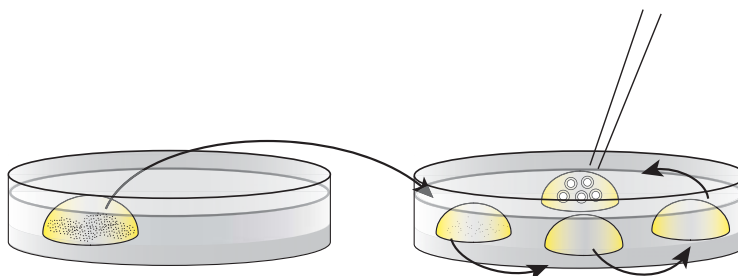
## 【Boîte contenant les ovocytes】



- Collecter et transférer rapidement les ovocytes dans la première goutte de 80  $\mu\text{L}$  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.

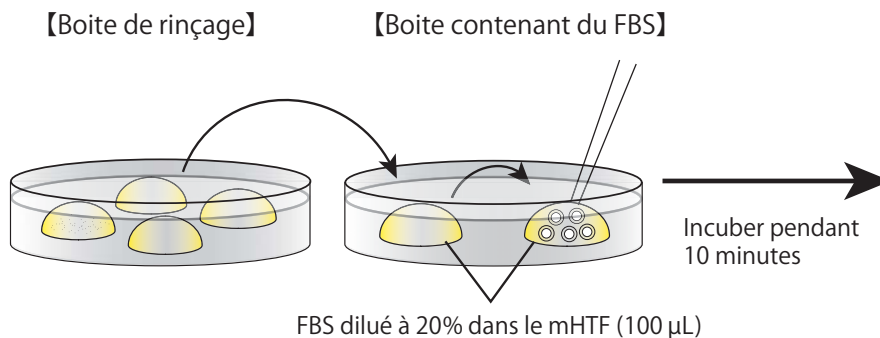
**Remarque**

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% CO<sub>2</sub>).



#### 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 épидidymaire 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

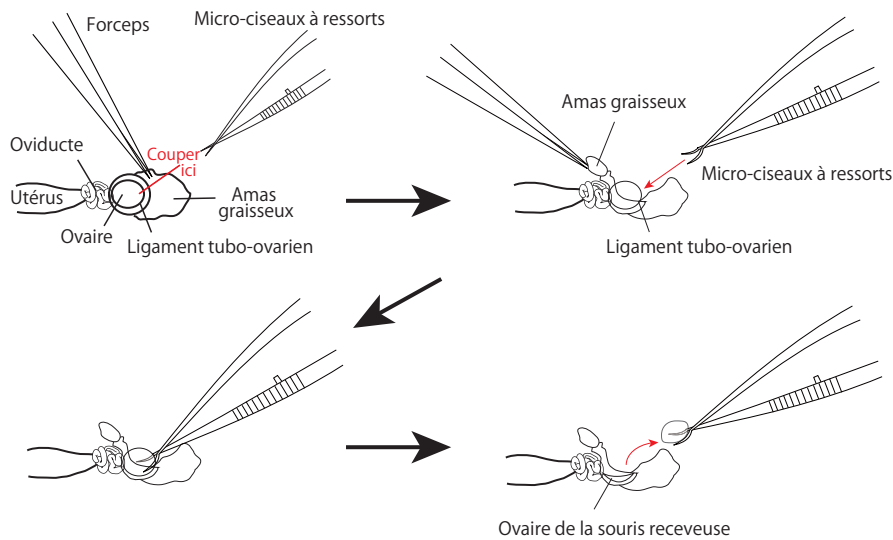
1. Les ovaires sont vitrifiés en utilisant la même méthode que pour les embryons (Reportez-vous au chapitre Vitrication simple d'embryons murins en page 54).

#### Transplantation

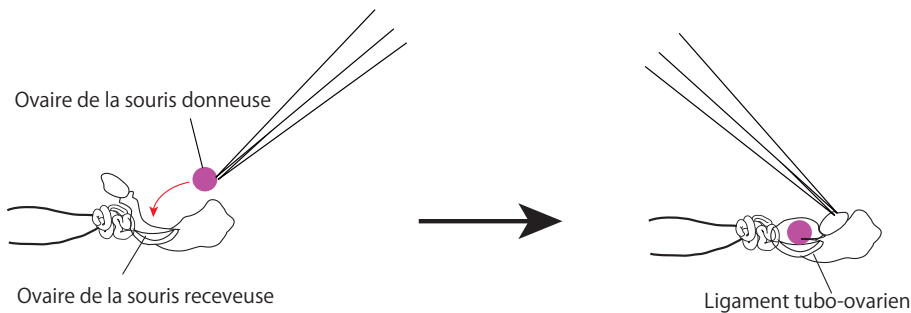
1. Anesthésiez la femelle receveuse.
2. Saisir l'appareil reproducteur (ovaire, oviducte et corne utérine) de manière conventionnelle (Reportez-vous au chapitre Réimplantation d'embryons par l'oviducte en page 67).
3. A l'aide de micro-ciseaux inciser approximativement 1/4 du ligament tubo-ovarien, ainsi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

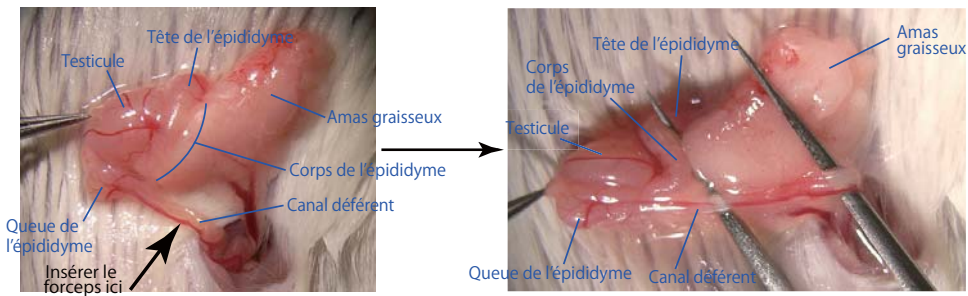
### Procédure

#### Vasectomie

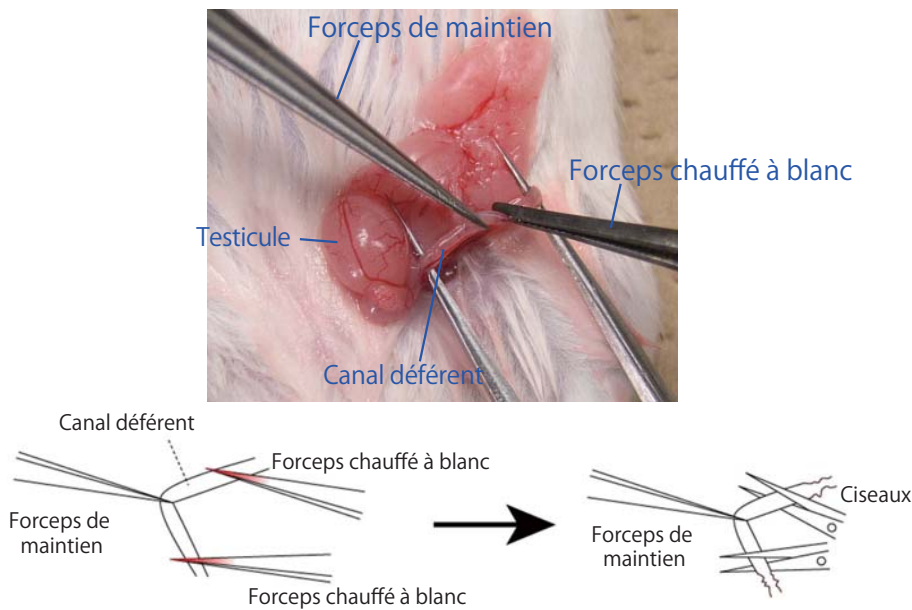
1. Anesthésier une souris male.
2. La procédure traditionnelle commence par une incision débutant au haut de la cuisse (pattes inferieures) et s'étendant sur 1cm environ en direction de la tête de la souris. Une fois l'abdomen incisé, exposez le testicule, l'épididyme, et le canal déférent.



- 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 subséquentement 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]



Accoupler avec les  
males vasectomisés

[Bouchon vaginal]

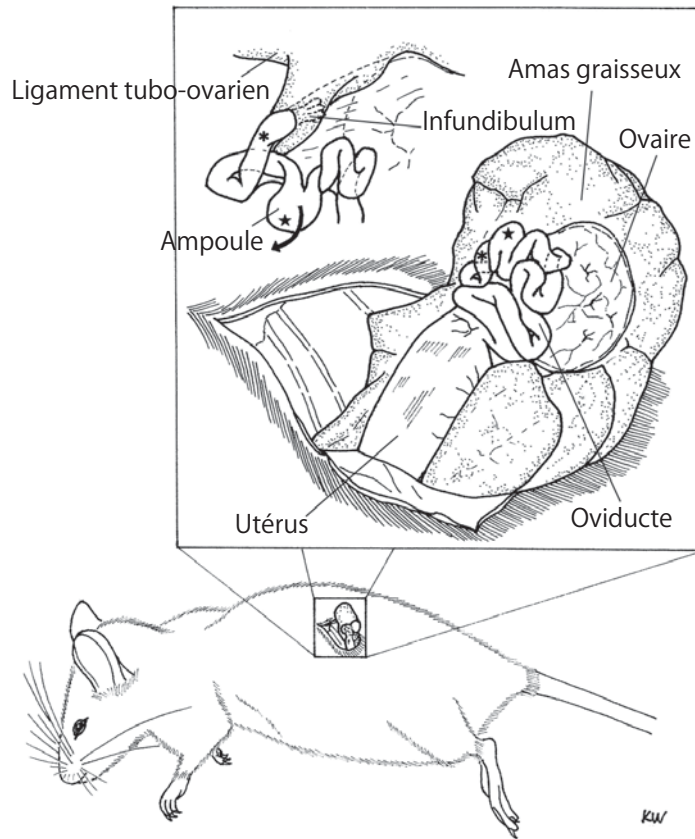


2. Anesthésiants
3. Micro-ciseaux à ressorts (lame de 5mm)
4. Une paire de forceps watchmaker's #5
5. Clamp (Serrefine)
6. Agrafes de suture (Autoclip 9mm; Clay Adams 427631) et applicateur d'agrafes (Mik-Ron Autoclip Applier; Clay Adams 427630)
7. Boîtes de Pétri (35mm X 10mm Cat. No. 430588; CORNING)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

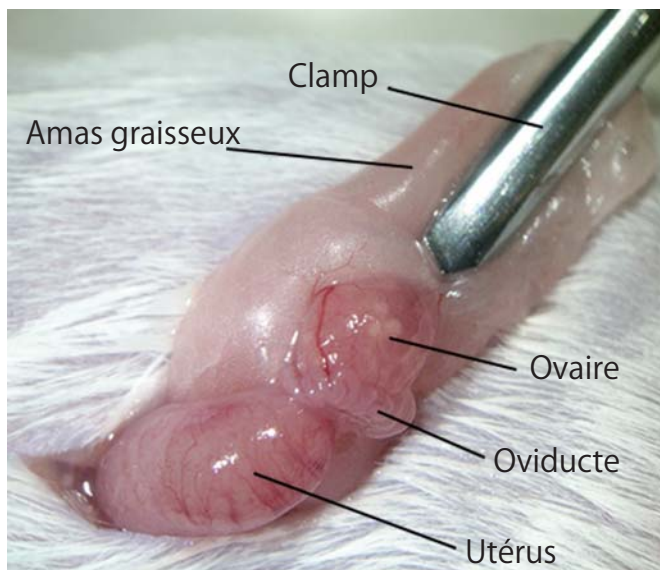
## Procédure

### Préparation des souris

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



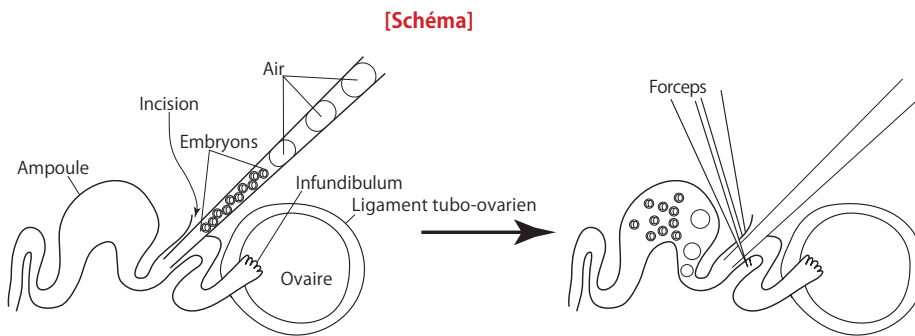
3. Clamper l'amas de graisse attaché au ligament tubo-ovarien.





## Positionner l'oviducte

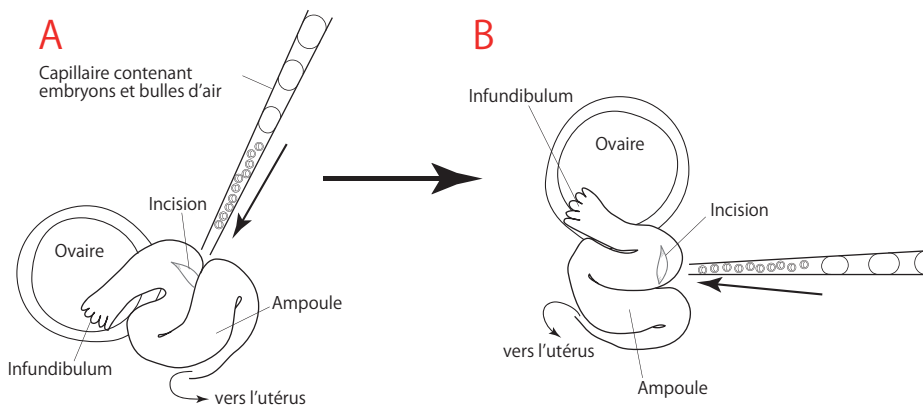
Comme indiqué sur le schéma ci-dessous, la réimplantation par l'oviducte comporte trois étapes : inciser l'oviducte, insérer le capillaire, et décharger les embryons dans l'oviducte en direction de l'ampoule.



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

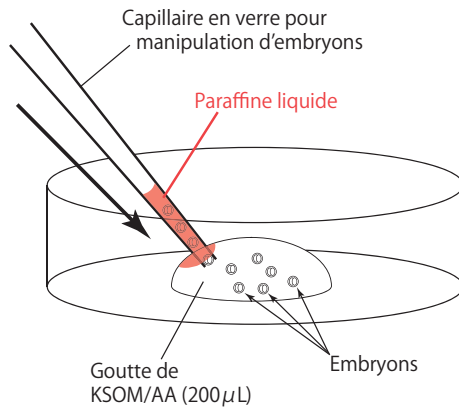
Chaque souris ayant des oviductes avec des replis différents, prenez le temps de bien observer et positionner l'oviducte pour faciliter la réimplantation.

### Remarque

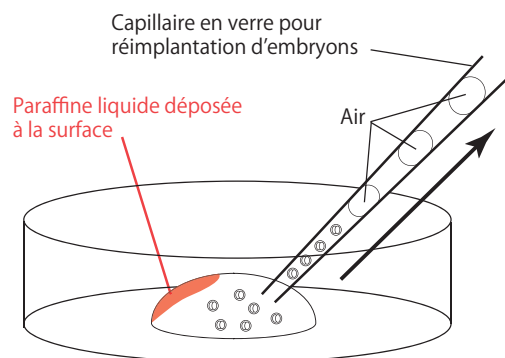
Si vous êtes gaucher, adaptez le positionnement pour une réimplantation du côté gauche.

### Préparation des embryons et des capillaires en verre

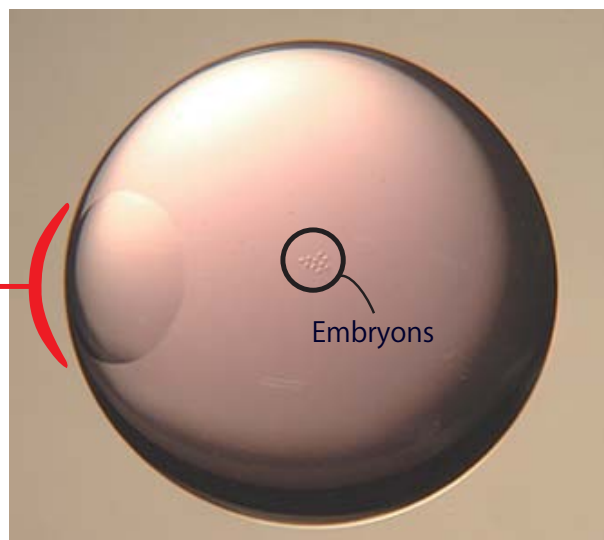
1. Placer une goutte de 200  $\mu\text{L}$  de KSOM/AA dans une boîte de Pétri (ne pas recouvrir de paraffine liquide) et déposer 20 embryons dans cette goutte.



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.



Paraffine liquide déposée à la surface



#### Remarque

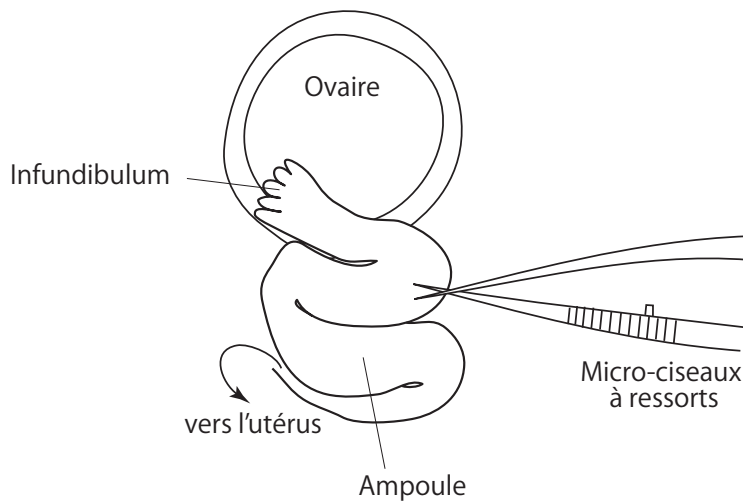
Lorsque le capillaire est inséré dans la goutte pour la première fois, la paraffine liquide se dépose à la surface de la goutte du côté de la pénétration du capillaire.

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

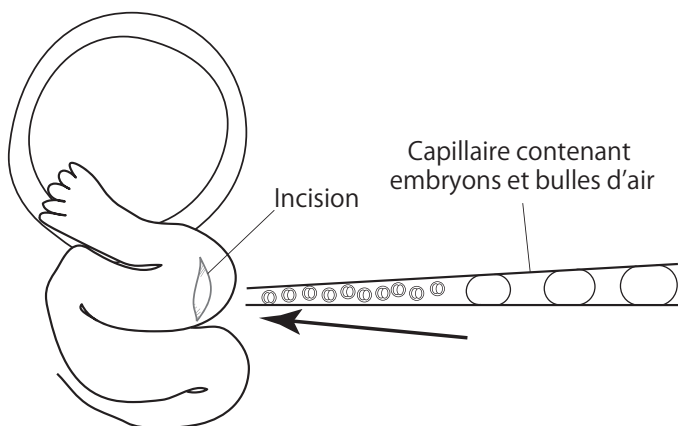
La paraffine liquide est potentiellement néfaste au bon développement des embryons jusqu'à la mise-bas.

## Réimplantation

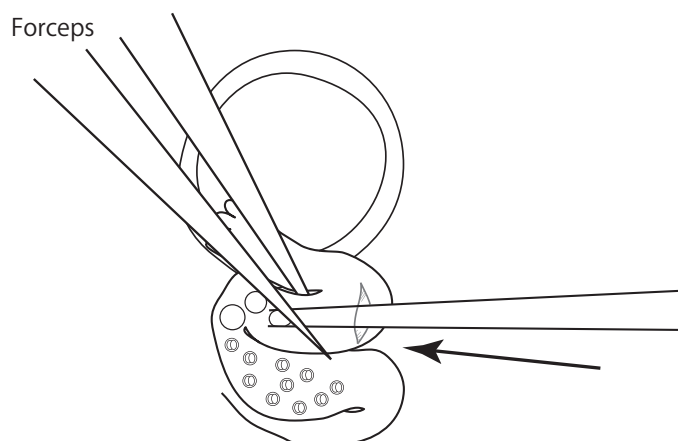
1. Positionnez l'oviducte avec les forceps watchmaker's #5 et faites une petite incision avec les micro-ciseaux dans la paroi de l'oviducte, entre l'infundibulum et l'ampoule.



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.



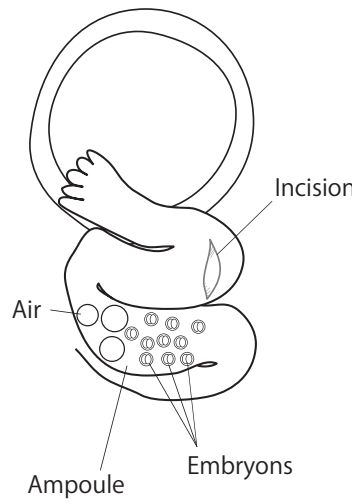
### Remarque

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

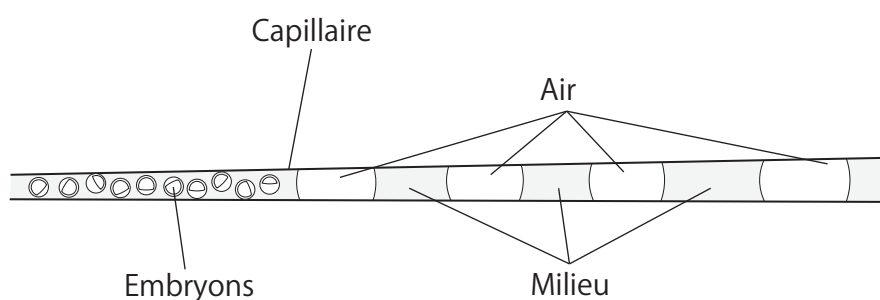
1. Souris femelles au troisième jour de pseudogestation (les femelles sélectionnées ont un bouchon vaginal au premier jour).
2. Anesthésiants
3. Ciseaux de dissection
4. Une paire de forceps watchmaker's #5
5. Clamp (Serrefine)
6. Aiguille de 27 gauges
7. Agrafes de suture (Autoclip 9mm; Clay Adams 427631) 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).

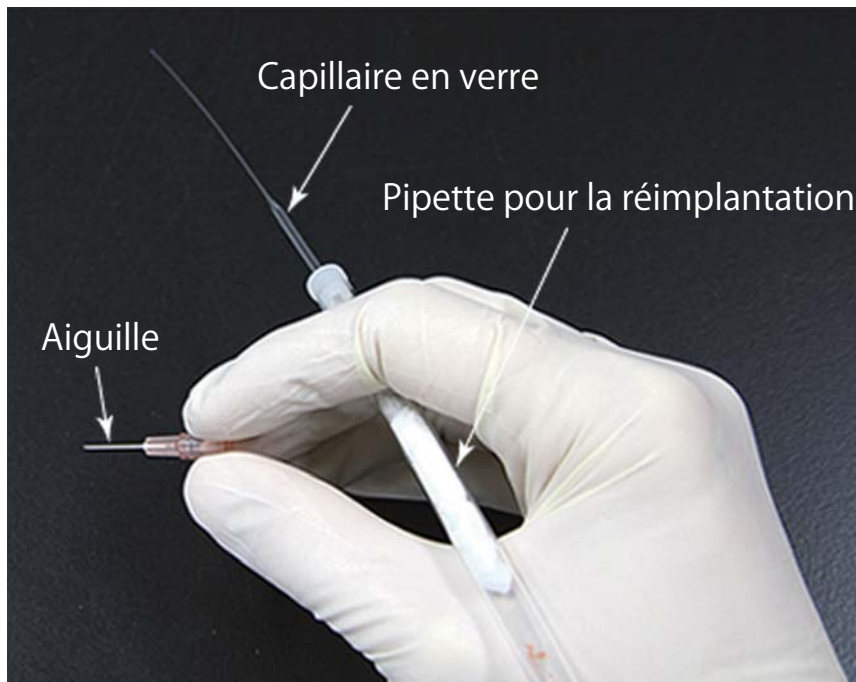
1. Saisir l'appareil reproducteur (ovaire, oviducte, corne utérine) de manière conventionnelle.
2. Clamper l'amas de graisse attaché au ligament tubo-ovarien.
3. Aspirer alternativement un peu de milieu et d'air pour créer des bulles de 2 à 3 mm dans le capillaire, puis aspirer 10 embryons dans le capillaire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



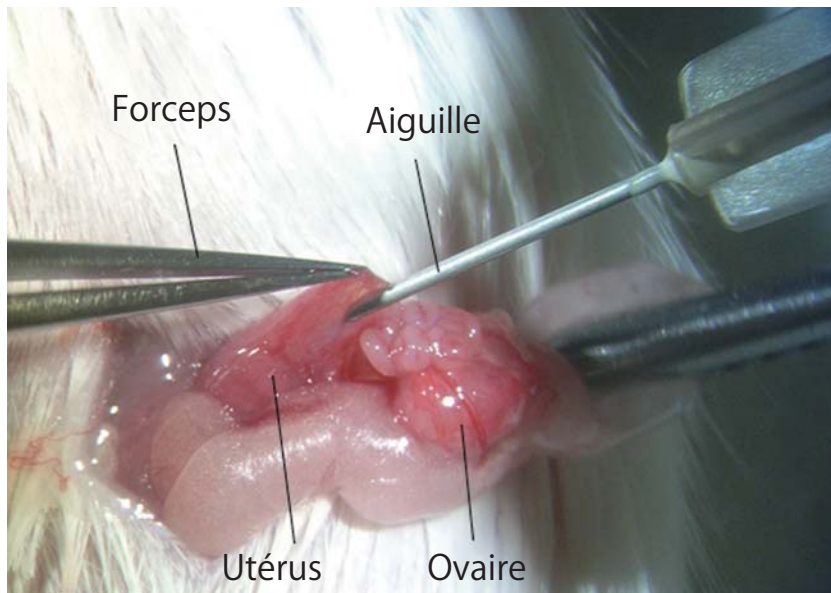
#### Note

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

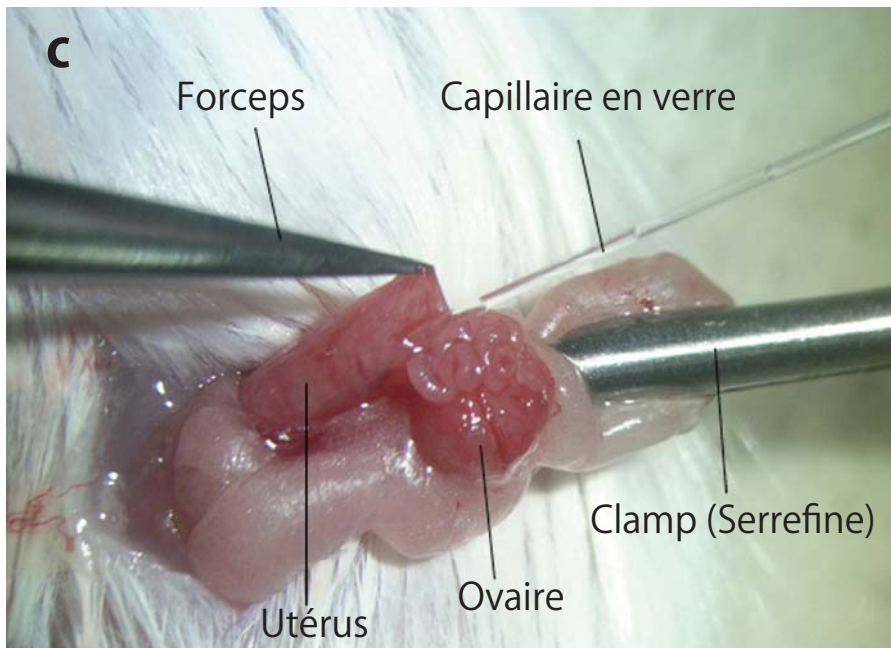
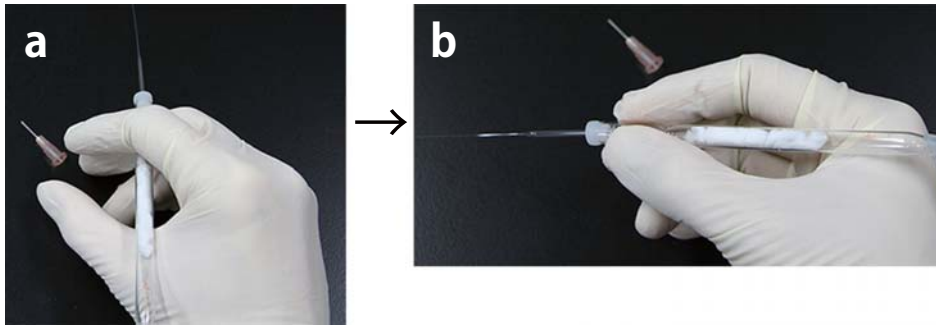
4. Tenez l'aiguille de 27 gauges et le capillaire de réimplantation de la manière illustrée ci-dessous. Observez simultanément le bout du capillaire et l'utérus au microscope, et assurez-vous de placer les deux dans le même plan focal.



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

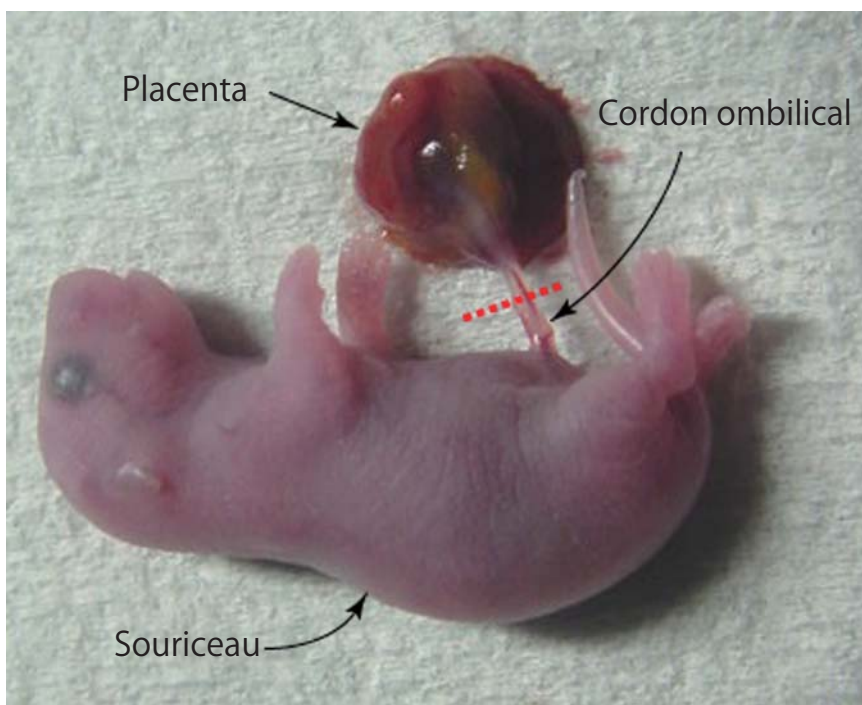
1. Mère adoptive (souris ayant mis bas le même jour ou le jour précédant la date théorique de la mise-bas de la souris enceinte).
2. Ciseaux de dissection
3. Une paire de forceps watchmaker's #5
4. Plaque chauffante (37°C)
5. Souris enceinte (ayant un retard de mise-bas par rapport à sa date théorique).

### 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

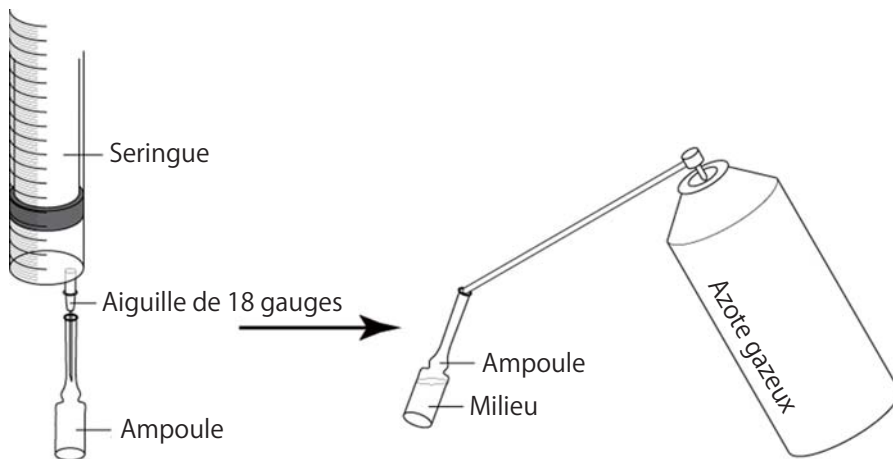
1. Rincer les ampoules en verre à l'eau courante.
2. Rincer les ampoules à l'eau distillée deux fois.
3. Stériliser les ampoules à haute température (180°C pendant 3 heures minimum).

#### 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 <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4.9	Sigma	M 2773
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.4	Sigma	P 5655
CaCl <sub>2</sub>	57.0	Sigma	C 5670
NaHCO <sub>3</sub>	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
<b>BSA</b> (Sérum d'Albumine de Bovin, Fraction V sans acide gras)	400	MERCK/ CALBIOCEM	126575
<b>0.5% phenol red</b>	<b>0.04 mL</b>	<b>Sigma</b>	<b>P 0290</b>

\*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 <sub>2</sub>	12.0	Sigma	C 5670
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20.0	Sigma	P 5655
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.0	Sigma	M 2393
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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 <sub>2</sub>	12.0	Sigma	C 5670
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20.0	Sigma	P 5655
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.0	Sigma	M 2393
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.75	Sigma	P 5655
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4.95	Sigma	M 2773
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	25.0	Sigma	C 7902
NaHCO <sub>3</sub>	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 <sub>2</sub>	12.0	Sigma	C 5670
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20.0	Sigma	P 5655
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.0	Sigma	M 2393
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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 <sub>2</sub>	12.0	Sigma	C 5670
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20.0	Sigma	P 5655
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.0	Sigma	M 2393
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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 <sub>2</sub>	12.0	Sigma	C 5670
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20.0	Sigma	P 5655
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.0	Sigma	M 2393
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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 <sub>2</sub>	12.0	Sigma	C 5670
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20.0	Sigma	P 5655
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.0	Sigma	M 2393
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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 <sub>2</sub>	12.0	Sigma	C 5670
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20.0	Sigma	P 5655
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.0	Sigma	M 2393
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16.2	Sigma	P 5655
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	29.4	Sigma	M 7774
NaHCO <sub>3</sub>	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](mailto:export@cosmobio.co.jp)

Web: [www.cosmobio.com](http://www.cosmobio.com)

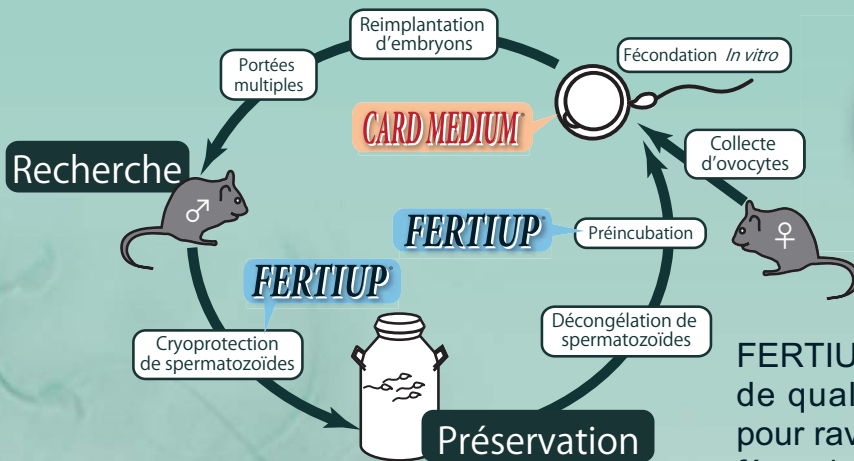
# FERTIUP®

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

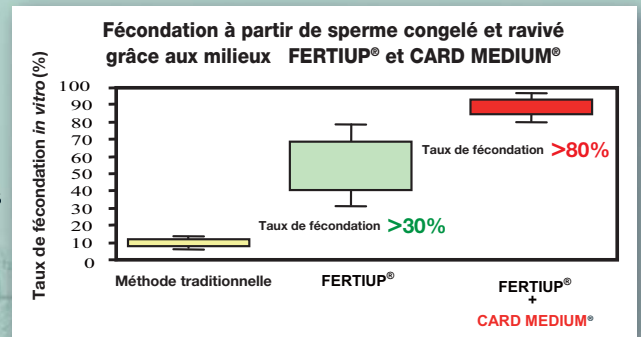


CARD MEDIUM®  
KYD-003-EX

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
<b>FERTIUP® Agent CryoProtecteur : ACP</b>	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
	<b>FERTIUP® Milieu de Préincubation : PM</b>	KYD-002-EX
	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
	<b>CARD MEDIUM®</b>	KYD-003-EX
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)		
<b>FERTIUP® PM 1ML &amp; kit CARD MEDIUM®</b>	KYD-004-EX	1 set
FERTIUP® Milieu de Préincubation pour sperme murin x1 flacon (1 mL) + CARD MEDIUM® x 1 kit		
<b>FERTIUP® PM 0.5ML &amp; kit CARD MEDIUM®</b>	KYD-005-EX	1 set
FERTIUP® Milieu de Préincubation pour sperme murin x1 flacon (0.5 mL) + CARD MEDIUM® x 1 kit		

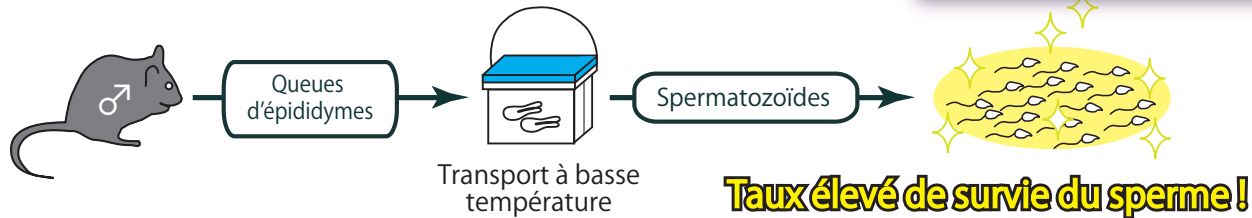
## KIT DE TRANSPORT A BASSE TEMPERATURE CARD

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



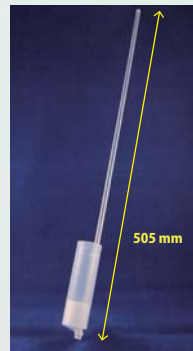
KYD-006-EX



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

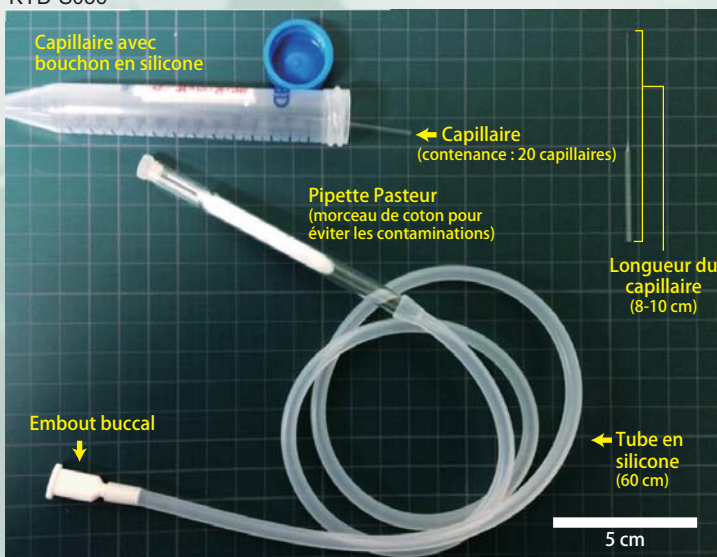


**Gobelet pour la congélation**  
KYD-S018

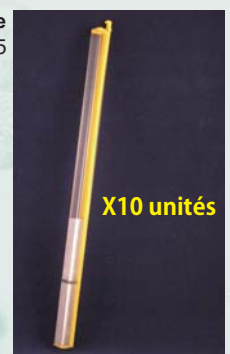


**Connecteur pour Paillettes**  
KYD-S025

**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<sup>®</sup>

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<sup>®</sup>

**Excellent pour la FIV.**

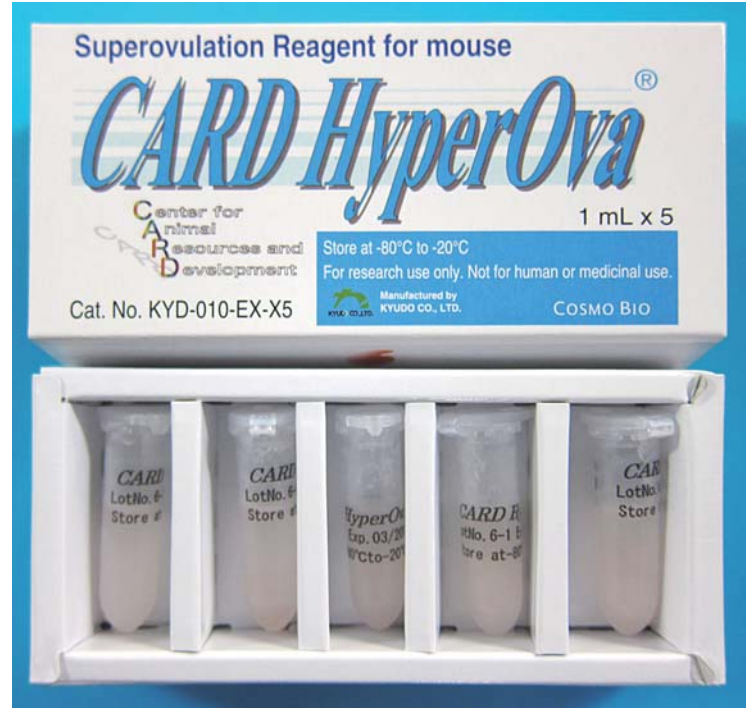
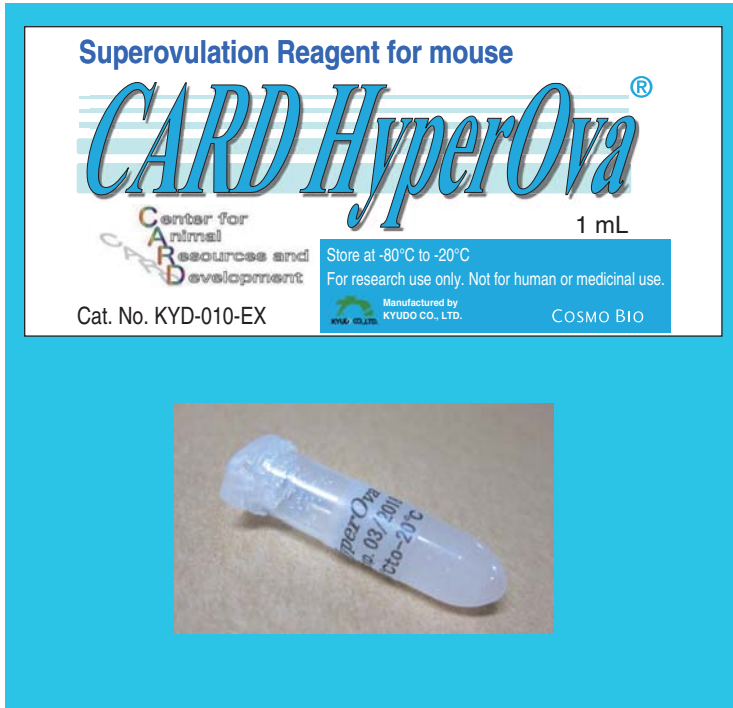
**Choisissez HyperOva<sup>®</sup> pour obtenir plus d'ovocytes ovulés.**

CARD  
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<sup>®</sup> en combinaison avec l'agent Cryoprotecteur de sperme murin FERTIUP<sup>®</sup>, le milieu de préincubation pour sperme murin FERTIUP<sup>®</sup>, et le CARD MEDIUM<sup>®</sup> pour la fécondation in vitro chez la souris.



COSMO BIO CO., LTD.



### 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



COSMO BIO CO., LTD.

Cherchez!

cosmobio





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

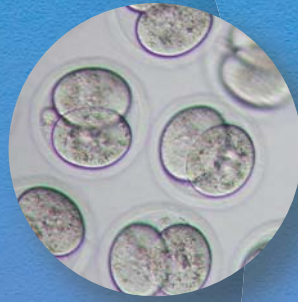
Manuel Technique

## **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

