SARAH MADANI | ANABELLA MARCONETTO | MARIANA DE NADAI

WEN BIN CHEN | ZOLTÁN MACHÁTY | GÁBOR VAJTA

À propos des ovocytes et des embryons

Volume 2. Méthodes

2022 - 2023

PAGE DESIGNS, GRAPHICS: NARA YU, CHINA

FRONT PAGE ILLUSTRATION: ÁGNES MARCZALI, HUNGARY

SOMMAIRE

Avant-propos du Volume 2 4

Chapitre I. Production in vitro des embryons bovins transférables 9

1. Prélèvement des ovaires/ovocytes, transport au laboratoire (Jour -1) 9
2. Récupération des ovocytes à partir des ovaires obtenus à l'abattoir (Jour -1, suite) 11
3. Sélection, lavage et maturation in vitro (MIV) des ovocytes (Jour-1, suite) 14
4. Préparation du sperme et fécondation in vitro (FIV) (Jour 0) 16
5. Culture in vitro (CIV) des embryons (Jour 1 à Jour 7) 18

Chapitre II Cryoconservation des embryons bovins produits in vitro 20

1. Vitrification : équilibrage, déshydratation, refroidissement et stockage 22
2. Réchauffement et réhydratation au laboratoire des embryons bovins vitrifiés dans les OPS 29
3. Réchauffement des embryons bovins après vitrification OPS pour transfert direct 32

Addendum 35

1. Défini ou non - le problème de la supplémentation en protéines 35
2. Azote liquide et sécurité au travail 36
3. Efficacité et stabilité 36
4. Techniques spéciales pour les situations particulières 39

Références 41

Remerciements et commentaires finaux 43

Produits VitaVitro Shenzhen de FIV Animale 44

AVANT-PROPOS DU VOLUME 2

(Si ennuyeux, ne lisez pas)

Deux objectifs nous ont motivés à poursuivre nos efforts concertés.

Nous avons reçu beaucoup de retours positifs et pourtant avons eu une sorte de remords : nous avons critiqué tout et tout le monde, mais en donnant peu de vraies réponses aux questions de type “comment faire”. Derrière chaque commentaire sympathique, nous soupçonnions un hochement de tête avec cette fameuse réflexion : “eh bien, chers sages, et si vous nous donniez quelque chose de vraiment précieux, pas seulement des petites informations primitives, mais des méthodes, des protocoles, des manières de faire… voudriez-vous ?”

L’autre raison était indépendante du premier volume - un problème connu par beaucoup, mais négligé par presque tout le monde jusqu’à récemment. Les différences d’efficacité globale entre les cliniques d’un même pays, d’une même région et d’une population similaire de patients. Des différences qui ne peuvent s’expliquer que par des interventions inappropriées. Aucun autre domaine de la médecine humaine ne pouvait se le permettre, aucune autorité ne tolérerait des taux de réussite quatre fois inférieurs dans un service par rapport aux autres cliniques - et ces données stupéfiantes ont été officiellement publiées dans les pays des grands pionniers de la FIV, avec des traditions de renommée mondiale et des réglementations strictes. Qu’en est-il du reste ? Des expériences personnelles aléatoires et des déclarations passagères suggèrent la même situation- ou même pire - dans de nombreux pays à travers le monde.

Nous avons besoin d’une solution ici et maintenant.

Notre petite équipe internationale ne peut pas lutter contre certains problèmes, notamment les mauvais aspects de la commercialisation (concurrence, confidentialité), le manque de transparence ou l’absence de conséquences juridiques d’une inefficacité évidente. Nous ne pouvons pas non plus changer les systèmes d’éducation et d’accréditation - bien que ces facteurs contribuent considérablement à cette situation regrettable.

On peut cependant utiliser la stratégie alternative, celle que nous avons proposée dans le tome 1 pour résoudre un problème scientifique : qui consiste à trouver - et réparer- le maillon le plus faible de la chaîne.

L'analogue "chaîne" est plus plausible qu'il n'est censé l'être. Les moyens établis de *transfert de technologie* en matière de procréation assistée sont insuffisants.

- Les outils, solutions et techniques sont principalement introduits en laboratoire par *des distributeurs* qui n'ont pas le temps, aucune connaissance de base et seulement des informations très superficielles sur le produit.
- Lors *des expositions*, l'accent est mis sur le café, les repas, les discussions avec de vieux amis et la collecte de cadeaux.
- *Les conférences* peuvent susciter l'intérêt, mais ne peuvent pas fournir des détails techniques.
- *Les ateliers*, même ceux qui offrent un apprentissage "pratique", sont généralement encombrés et de courte période ; dans les cas les plus rares et avec un peu de chance, vous pouvez faire une tentative infructueuse pour essayer la technique une fois ; la pratique répétée est presque hors de question dans la majorité des cas.
- *Les manuels* et les brochures sont soit trop courts et manquent d'informations essentielles ; ou trop long et personne ne les lira complètement avec l'attention requise.
- *Les vidéos pédagogiques* sont généralement superficielles, avec des informations disposées de manière linéaire ; il n'y a aucun moyen d'interagir ni la possibilité d'avoir certains détails requis.
- *Des visites personnelles dans* un laboratoire réputé sont la meilleure façon d'apprendre, mais c'est uniquement le privilège de quelques scientifiques chanceux.
- Enfin, *l'enseignement en chaîne* entre scientifiques individuels, qui constitue le mode le plus fréquent du transfert de la technologie, est aussi la principale source de maladresses, érodant la technique à chaque démonstration pédagogique successive.

Avec ce tome 2, nous revenons avec une autre tentative. Nous voulons fournir un manuel rationalisé et simple des procédures complexes, y compris *la production* et la vitrification des embryons bovins à des fins commerciales et dans le cadre de la recherche scientifique, les problèmes de laboratoire dans le domaine de la reproduction humaine assistée et du transfert de noyau de cellules somatiques chez les mammifères non- primates. Ces chapitres peuvent servir d'approche de base pour atteindre l'objectif donné, avec une efficacité prouvée dans différentes situations. De brèves explications sur les étapes critiques et les choix seront également fournies.

Nous savons que nos suggestions ne sont pas les seuls moyens de faire de bons embryons et d'avoir de bons résultats. Mais, elles sont simples, peu coûteuses, rapides et plus efficaces que la plupart

des méthodes couramment utilisées. Quelques connaissances de base en embryologie pratiquée en laboratoire sont indispensables à leur application. Ces techniques peuvent être un bon choix si vous souhaitez progresser rapidement en améliorant vos systèmes inefficaces et/ou incohérents.

Cependant, évitez les erreurs courantes. Tout d'abord, suivez strictement ce qui est décrit ici. Répétez les procédures pendant des semaines, voire des mois. La pratique est essentielle ; toutes les petites étapes doivent être effectuées automatiquement, comme changer de vitesse dans une voiture manuelle - ou s'agit-il déjà d'un analogue obsolète ? Ne rien modifier après les deux, trois ou quatre premiers fiascos ; nos instructions sont correctes et nos méthodes fonctionnent bien dans différents pays et sur différents continents. Le hic peut résider dans la réalisation. Mieux vaut se tourner vers nous immédiatement que de modifier sans cesse. Enfin, évitez la construction élective de votre version spéciale avec différentes parties collectées à partir de divers protocoles. L'embryologie de laboratoire n'est pas un ensemble de jouets LEGO, mais plutôt un puzzle, où tous les éléments ont leurs caractéristiques uniques et peuvent ne pas convenir à un milieu différent.

Une fois que vous atteignez l'efficacité appropriée, vous aurez encore des tonnes d'opportunités pour améliorer le système. Mais avant cela, faites-nous confiance et suivez-nous - ou parlez-nous (voir ci-dessous).

Tous les chapitres du Volume 2 seront publiés en ligne, avec tous les bénéfices et les avantages de la publication en ligne. Nous avons convenu que :

- nous offrirons un accès libre aux personnes intéressées après inscription gratuite
- l'objectif est de fournir un guide dynamique et en constante amélioration
- tous les membres inscrits peuvent envoyer des idées, des suggestions et des corrections
- toutes les contributions écrites seront collectées, classées en fonction du sujet et publiées
- après sélection, celles-ci seront incorporées dans le manuel (la sélection et l'incorporation seront le privilège des auteurs, mais les avis seront toujours pris en considération).

Quelques modifications techniques et formelles supplémentaires :

- Dans le Volume 2, les auteurs des versions linguistiques initiales du Volume 1 contribuent à parts égales à la création des chapitres qui seront répertoriés dans toutes les éditions.

L'Institut danois des sciences agricoles, berceau de nombreuses technologies embryonnaires

- Nous souhaitons la bienvenue à Wen Bin Chen, responsable du laboratoire expérimental de VitaVitro, dans l'équipe, reconnaissant sa contribution, sa traduction chinoise et son aide précieuse dans le volume 2
- Pour ce volume, grâce à notre auteur-traductrice la plus polyvalente, Sarah Madani, la traduction française remplacera l'ancienne version arabe.
- Pour résoudre le problème créé par l'important travail versus le besoin urgent, nous travaillerons en parallèle sur les différentes parties et les publierons individuellement.
- Linkedin, Facebook, Instagram et Tweeter seront utilisés encore plus largement qu'auparavant pour vous informer des publications, des mises à jour et des changements majeurs.

Merci de votre intérêt, visite et votre contribution active attendue.

VitaVitro, Shenzhen, Chine, où de nouvelles idées sont réalisées

À QUOI POUVEZ-VOUS VOUS ATTENDRE ?

- **À partir des ovaires de bonne qualité, 6 à 8 ovocytes compétents pour le développement**
- **Un taux d'environ 50% de blastocystes / ovocytes collectés (!) au 7ème jour de la culture embryonnaire *in vitro***
- **Près de 100% de survie et de développement après cryoconservation**
- **De bons taux de gestation et de vêlage (déterminé principalement par le cheptel receveur et le transfert)**
- **Pas de diminution de ces paramètres après cryoconservation et transfert direct**
- **Pas d'augmentation notable des anomalies du développement ou du syndrome de la grande progéniture**

CHAPITRE I. PRODUCTION IN VITRO DES EMBRYONS BOVINS TRANSFÉRABLES

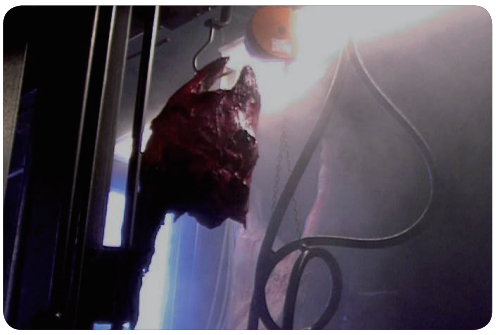
1 Prélèvement des ovaires/ovocytes, transport au laboratoire (Jour -1)

L'organisation logistique dépend de la situation locale, de la source des matériaux et de la finalité du travail.

1.1 Pour les ovaires et les ovocytes issus des abattoirs

1.1.1 L'idéal est d'avoir un abattoir de bétail à 100 km de distance (c'est-à-dire à deux heures de route) prêt à collaborer, qui effectue un abatage régulier de 15 à 60 vaches (moins de préférence pour les génisses) par jour d'abattage de routine. Veuillez noter que cette collaboration est toujours une faveur du côté de l'abattoir. Créer une conduite positive est l'une des tâches les plus difficiles en PIV chez les bovins, nécessitant diverses techniques et de la créativité.

Les ovaires peuvent être prélevés par un travailleur local compétent, fiable (et apprécié) ou par le personnel de laboratoire. Dans les deux cas, les ovaires avec une quantité minimale de tissu adipeux doivent être placés dans une bouteille thermos en plastique décontaminée et à moitié remplie de sérum physiologique stérile à 25-30°C. Ces flacons sont ensuite placés en toute sécurité dans une simple glacière (également emballée avec des ciseaux, des gants, des mouchoirs, etc.) et transportés en voiture jusqu'au laboratoire - sans autre contrôle de la température, à moins que des conditions extrêmes ne surviennent pendant le transport. Pour éviter tout dommage irréversible aux ovocytes, le délai entre l'abattage et le début de l'aspiration des ovocytes ne doit pas dépasser 5 à 6 heures, bien que des descendants vivants aient également été produits à partir d'ovocytes aspirés 24 heures après l'abattage[1].



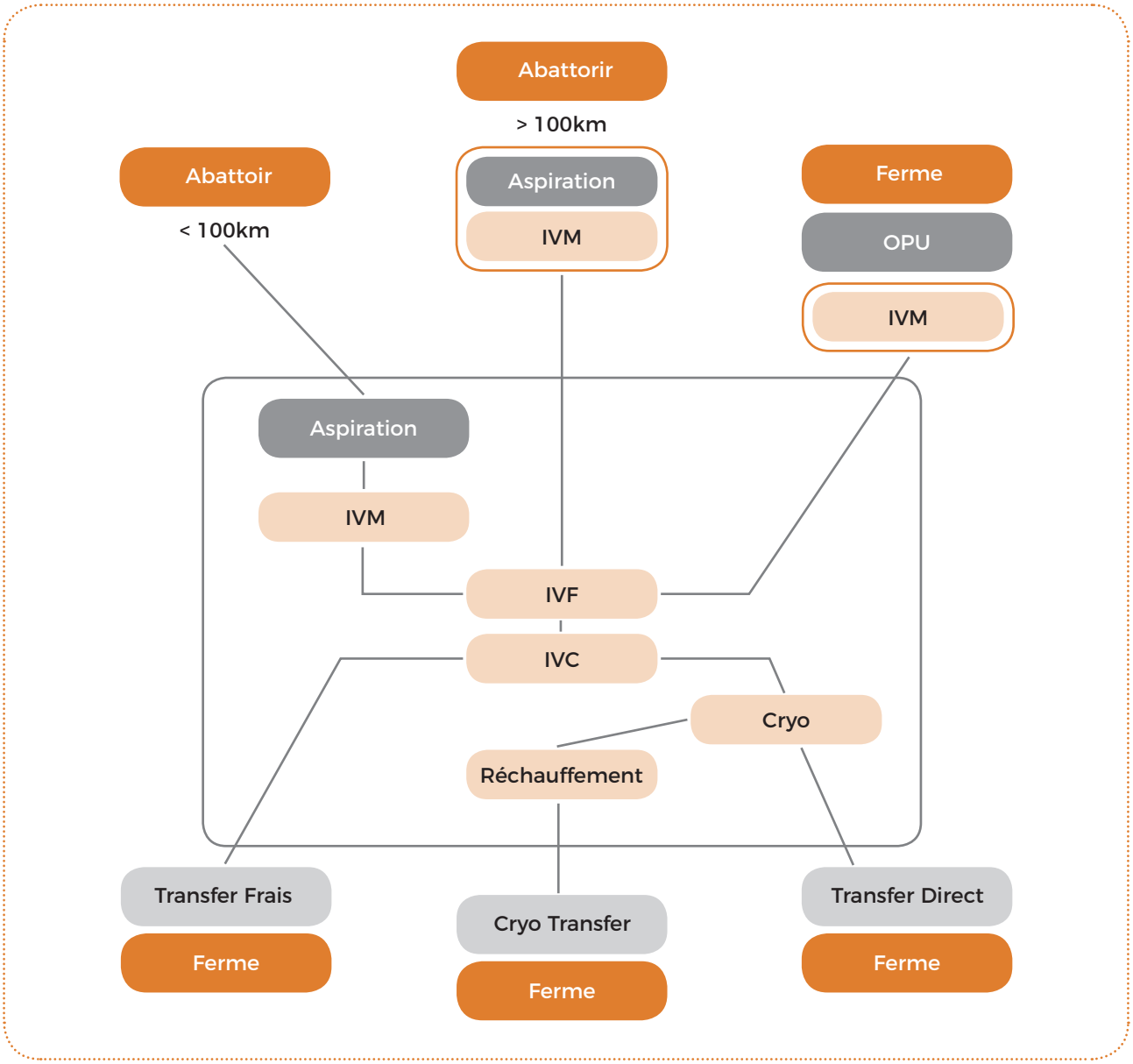
1.1.2 L'alternative détestable - *un abattoir éloigné* - rend les choses plus compliquées, beaucoup plus coûteuses et, à long terme, difficiles à maintenir. Pour ces situations, vous devez mettre en place ou louer une installation à proximité de l'abattoir : une salle propre avec un équipement de laboratoire très basique nécessaire à la fois à l'aspiration et à la récupération des ovocytes et utilisé seulement 1 à 2 heures par jour. Aussi, un personnel qualifié, qui passe le reste de la journée à travailler en ligne (rarement) ou à faire du tourisme avec toutes les activités annexes. Vous devez également résoudre le problème de transport. À l'âge d'or des années 90, nous pouvions nous rendre à la gare locale d'une zone rurale éloignée du Danemark et demander au conducteur de train de transmettre la caisse de transport (chauffée avec précision) à notre collègue qui l'attendait au quai de Copenhague.

Le tout gratuitement, pour le bien de la science. Cependant, après le 11 septembre, les choses sont devenues moins détendues, surtout lorsqu'il s'agissait de fret aérien. Bien que, dans certains pays, les services professionnels fournissant des ovocytes dont la maturation est faite *in vitro* puissent être disponibles, ceci n'est pas une option pour la plupart des laboratoires de recherche dont le budget est généralement serré.

Comme cet arrangement comprend la récupération des ovocytes en laboratoire et le transport dans des incubateurs spéciaux et des tubes également utilisés après le prélèvement des ovules (OPU), les détails seront discutés dans le chapitre suivant.

1.2 Pour le prélèvement d'ovules (OPU)

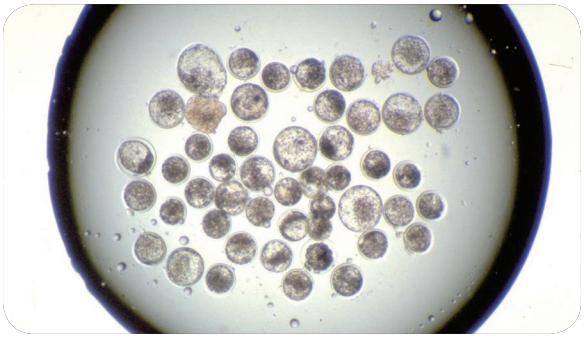
L'autre option est le prélèvement intravaginal et écho-guidé in vivo des ovules. Il s'agit d'un mélange de la technique utilisée en FIV humaine et du résultat d'un travail lié à l'abattoir, c'est-à-dire la collecte d'ovocytes immatures sans stimulation hormonale préalable. La plus grande partie du travail est effectuée par un vétérinaire qualifié ; le rôle de l'embryologiste est de fournir des milieux de rinçage préchauffés et des tubes de collecte. Assurez-vous de stocker les tubes dans des supports chauffants, qui soient également maintenus au chaud pendant l'aspiration dans des dispositifs spécialement conçus pour cette procédure (comme https://store.agtechinc.com/products/pocket-tube-heater-with-battery-wta). Par la suite, le travail de récupération des ovocytes est pratiquement le même que chez l'homme et toutes les versions du travail décrites ci-dessus chez les bovins. Voir les détails dans le chapitre suivant.



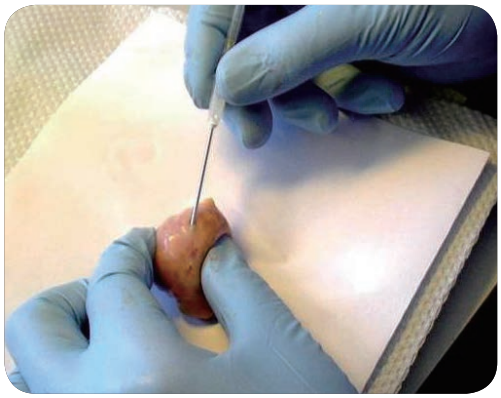
2 Collecte des ovocytes à partir des ovaires obtenus à l'abattoir (Jour -1, suite)

Deux procédures reconnues existent pour la récupération des ovocytes à partir des ovaires obtenus à l'abattoir : le tranchage avec une lame chirurgicale très aiguisée et l'aspiration avec une aiguille hypodermique épaisse en utilisant une pression négative modérée.

Bien que plus d'ovocytes puissent être collectés avec le tranchage, le travail est assez laborieux, nécessite beaucoup de temps et de solutions, crée un gâchis et donne des ovocytes de qualité mixte. En conséquence, le tranchage n'est recommandé que pour les ovaires de vaches de valeur décédées, où chaque ovocyte peut représenter une chance de préserver le matériel génétique spécial.



En utilisant le tranchage, 47 blastocystes du J7 ont été obtenus à partir des deux ovaires d'une vache de valeur abattue - sans stimulation

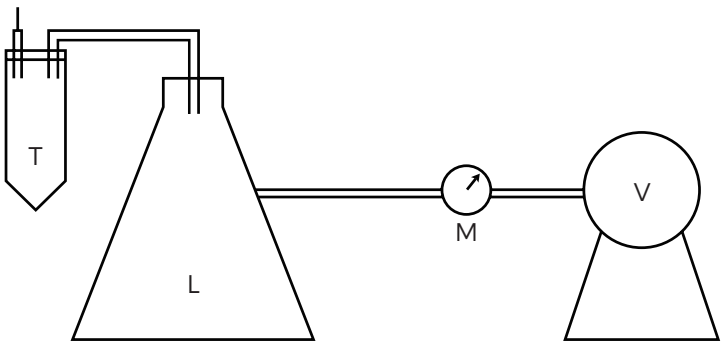


Pour la production en masse d'ovocytes à des fins expérimentales - et potentiellement commerciales -, l'aspiration est beaucoup plus pratique. C'est une technique rapide, efficace et fiable avec un résultat constant si elle est effectuée correctement. À partir des animaux de bonne qualité et bien nourris, 80 à 90 % des ovocytes récupérés peuvent être utilisés pour la maturation et le développement ultérieur.

L'aspiration peut être réalisée avec une simple seringue et une aiguille hypodermique. Cependant, il s'agit probablement de la seule situation en rapport avec la production d'embryons en laboratoire où nous suggérons une configuration plus compliquée - pour des raisons évidentes.

Tenir et déplacer la seringue avec la même main qui est censée créer la pression négative appropriée est presque impossible. Certains ovocytes seront dénudés par le vide soudain et agressif, tandis que d'autres resteront dans le follicule si la force de succion appliquée est insuffisante. Malheureusement, ces faits sont ignorés dans la plupart des laboratoires animaliers jusqu'à aujourd'hui.

Pour éliminer les incohérences et l'inefficacité, vous pouvez utiliser une *pompe à vide sophistiquée (et disproportionnellement coûteuse) développée pour l'OPU animale* et l'aspiration des ovocytes humains. Cependant, une *configuration beaucoup moins coûteuse et au moins aussi efficace* a été introduite il y a déjà 30 ans dans certains laboratoires d'embryologie bovine.



The schematic view of the suggested oocyte aspiration device. V: Vacuum pump, M: Manometer (optional), L: Large (500 or 1000 mL) glass vacuum flask to trap accidental overflow and mitigate changes of the vacuum caused by the various resistance when the needle enters the ovary, T: Tube for oocyte collection.

2.1 De quoi avez-vous besoin ?

1. Une pièce séparée pour le travail " sale "- une règle dans plusieurs pays et un aménagement fortement conseillé partout. Apporter du matériel d'abattage dans un laboratoire d'embryologie peut sérieusement compromettre la qualité de l'air et les mesures de stérilité. D'autre part, cette pièce séparée peut également être utilisée pour d'autres travaux non stériles, y compris le prélèvement d'organes reproducteurs ou comme espace consacré aux animaux de laboratoire.
2. Une simple pompe à vide à membrane, sans huile, à faible bruit et à faible vibration avec un vide constant

   Remarque : *les instruments de précision tels que les pompes péristaltiques peuvent ne pas avoir la capacité requise. Un équipement de laboratoire spécialement conçu à cette procédure peut être très coûteux. Une pompe à vide fonctionnant à l'eau du robinet peut être utilisée avec succès ; cependant, pour une meilleure cohérence, nous suggérons une pompe électrique légèrement plus chère et quelques articles de laboratoire usuels. Un appareil peu coûteux peut parfaitement convenir et peut être acheté pour 200 USD ou moins (aucun intérêt commercial).*

   Pour éviter les vibrations, la pompe peut être placée sur le sol du laboratoire.
3. Une fiole à vide en verre de 500 ou 1000 ml avec un bouchon en caoutchouc
4. Tubes de prélèvement sanguin Vacutainer en verre de 10 ml avec un bouchon en caoutchouc
5. Aiguilles hypodermiques jetables 14G (2,1x38 mm)
6. Tubes en silicone autoclavables et connecteurs tube-aiguille
7. Grande plaque chauffante avec des blocs en métal chauffants pour tubes à essai
8. Grande pince de laboratoire à pointe émoussée
9. Serviettes en papier, mouchoirs, gants, masques (si nécessaire), lunettes de protection (si nécessaire)
10. Milieu d'aspiration VitaVitro®

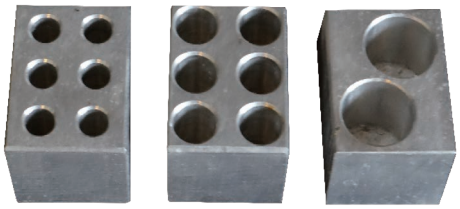
2

(example)

3

4

7



2.2 Durée de la procédure

Préparation (y compris les solutions de réchauffement)	1 h (travail efficace 30 min)
Aspiration à partir d'un ovaire	1 à 2 min (pour les praticiens expérimentés)

2.3 Préparation

1. Chauffer la plaque chauffante et les blocs chauffants à 30°C
2. Réchauffer la quantité requise (1 ml/ovaire) du milieu d'aspiration contenue dans les tubes Vacutainer à l'aide des blocs chauffants.

   Réchauffer les tubes Vacutainer vides pour l'aspiration et pour le transport au laboratoire
3. Assembler l'appareil d'aspiration selon la Fig. 1 (voir aussi la vidéo).

   Attention : *pour le réglage de la vitesse d'aspiration, les manomètres et les régulateurs de la pompe à vide peuvent être insuffisants et ne peuvent être utilisés que pour des réglages approximatifs.*

   Pour un réglage fin, montez l'ensemble de l'installation (y compris la bouteille à vide) et vérifiez le volume aspiré /durée de l'aspiration. La quantité approximative suggérée est de 10 ml/30 s.

   La valeur optimale peut différer d'un laboratoire à l'autre. Si vous obtenez un faible nombre d'ovocytes (moins de 6-8 par ovaire, augmentez le débit. Diminuez le débit si plus de 10 % des ovocytes collectés ont un cumulus insuffisant/endommagé. Pour un réglage précis, l'insertion de plusieurs aiguilles dans le bouchon en caoutchouc de la bouteille à vide peut être plus appropriée que d'ajuster les régulateurs de la pompe. L'aiguille insérée crée un raccourci et diminue légèrement le débit.
4. Nettoyer la zone avec de l'éthanol à 70 % ou un désinfectant de laboratoire approprié

2.4 Procédure

(Voir aussi la vidéo : https://vimeo.com/manage/videos/772914189, première partie)

1. Insérer deux aiguilles dans le bouchon du tube Vacutainer (comme sur le schéma page 12).

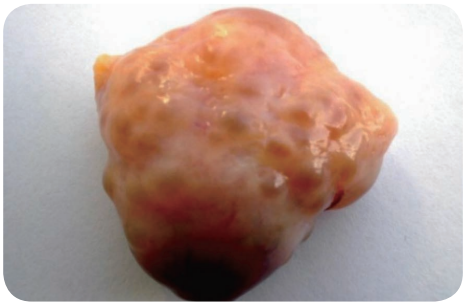
   L'une juste pour passer le bouchon, à connecter à la bouteille à vide

   L'autre enfoncée profondément, sera reliée aux tubes des aiguilles d'aspiration
2. Allumer la pompe
3. Commencer par aspirer environ 1 ml de milieu d'aspiration dans les tubes préchauffés
4. Retirer quelques ovaires du thermos, les garder sur la plaque chauffante et les couvrir avec une serviette en papier humide
5. Sécher un ovaire avec une serviette en papier sèche
6. En positionnant le trou vers le haut, insérer l'aiguille dans le tissu solide de l'ovaire

   ÉVITER de perforer la fine membrane d'un follicule visible !

   Cela peut entraîner une fuite et une perte du contenu
7. Pousser l'aiguille vers l'avant et entrer dans les follicules visibles par le dessous, pousser l'aiguille vers l'avant et vers l'arrière jusqu'à ce que le follicule s'effondre complètement.
8. Procéder de la même manière avec tous les follicules visibles, en utilisant 2 à 4 nouveaux points d'entrée par ovaire.

5



8

9. Lorsque le processus est fait pour tous les follicules antraux, commencer à aspirer un nouvel ovaire.
10. Arrêter l'aspiration avant que le tube ne soit plein et mettre le bouchon avec deux aiguilles dans un nouveau tube en verre. Fermer le tube plein avec le bouchon du nouveau tube utilisé.
11. Répéter les étapes 4 à 10
12. Si la sélection des ovocytes est effectuée par un collègue du laboratoire, assurez-vous que tous les tubes pleins soient transportés dans le chauffe-tube métallique dès que possible.
13. Si vous travaillez seule, arrêtez-vous 20 minutes après le début de l'aspiration des ovocytes, apportez les tubes au laboratoire et commencez la sélection des ovocytes.

    Une fois la sélection et le lavage terminés, placez les ovocytes dans la boîte de maturation et mettez la boîte dans l'incubateur avant de recommencer une autre série d'aspirations.

    Attention : *pour les points 12-13 : Une règle importante mais souvent oubliée :*

    PAS UN SEUL OVOCYTE NE DOIT PASSER PLUS DE 45 MIN SUR LA PAILLASSE, c'est-à-dire en dehors du follicule mais toujours pas dans l'incubateur ! Si cela représente un problème logistique, résolvez-le !

    N'oubliez pas non plus de désinfecter/nettoyer l'extérieur des tubes Vacutainer contenants les ovocytes avant de les apporter au laboratoire
14. Lorsque vous terminez avec le dernier ovaire, aspirez un peu plus de milieu d'aspiration pour être sûr de récupérer tous les ovocytes qui pourraient encore être dans le tube.

3 Sélection, lavage et maturation in vitro (MIV) des ovocytes (Jour -1, suite)

3.1 De quoi avez-vous besoin (pour 100 ovocytes) ?

1. Un laboratoire d'embryologie basique, idéalement avec une température ambiante de 25°C
2. Un incubateur avec 5% de CO_2 ou avec un mélange gazeux (5+5+90%) : 5% CO_2 + 5% O_2 + 90% N_2, une température de 38,5°C et une humidité maximale.
3. Un flux d'air laminaire, activé pendant les étapes de préparation uniquement
4. Stéréomicroscope avec une platine chauffée à 38,5°C
5. Plaque chauffante, chauffée à 38,5°C
6. Une boîte Nunc à quatre puits (4WD)
7. Milieu VitaVitro IVM Bicarbonate
8. Huile de paraffine lourde VitaVitro®
9. Une grande boîte de Pétri en plastique (100 mm de diamètre), utiliser une lame (ou une aiguille fine) et exercer une légère pression pour tracer des lignes fines espacées de 1 cm sur la surface externe du fond et la surface externe du couvercle (les marqueurs produisent de larges lignes sombres, ce qui pourrait masquer les ovocytes)
10. Deux petites boîtes de Pétri en plastique (33 mm de diamètre)
11. 15 ml de milieu d'aspiration
12. Micropipettes de 20-200-1000 µl avec embouts
13. Pipettes Pasteur en plastique jetables à usage unique

3.2 Durée de la procédure

La veille : préparation de la boîte :	10 min
Une heure avant : réchauffement	1 heure (5 min de travail efficace)

L'ensemble du processus de sélection, de lavage et de démarrage de la maturation in vitro doit être terminé en 20 à 25 min (en 45 min après le début de l'aspiration)

Remarque : *mieux vaut laisser quelques ovocytes dans le sédiment que de les prélever tous et de compromettre leur compétence de développement en les exposant trop longtemps à des conditions défavorables.*

Si vous ne pouvez pas respecter ce délai, prélevez les ovocytes à partir d'un nombre inférieur d'ovaires en une seule fois, lors de la prochaine manipulation.

3.3 Préparation

La veille, préparer une boîte de MIV, une boite à 4 puits avec 400 µl de milieu Bicarbonate IVM recouvert de 400 µl d'huile de Paraffine Lourde dans chaque puits

Incuber à 38.5°C dans 5% CO_2 dans l'air (ou mélange gazeux 5+5+90%) avec une humidité maximale pendant la nuit

Une heure avant le début de la procédure, mettre un total de 15 ml de milieu d'aspiration dans deux tubes Vacutainer de 10 ml et placer les dans un bloc chauffant métallique sur la plaque chauffante ajustée à 38,5°C.

3.4 Procédure

(Voir aussi la vidéo : https://vimeo.com/manage/videos/772914189, deuxième partie)

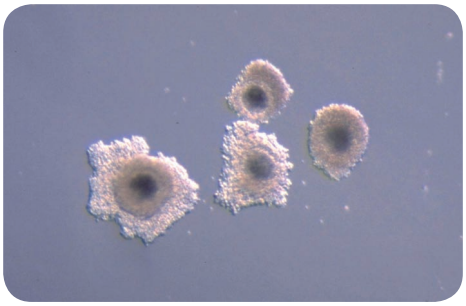
1. Remplir les deux petites boîtes de Pétri avec 3 ml de milieu d'aspiration chacune
2. Les tubes Vacutainer contenant les ovocytes prélevés peuvent être centrifugés pendant 2 minutes à 500 tr/min (pas indispensable)
3. Retirer le surnageant avec la pipette Pasteur (évitez de remuer les sédiments libres !) et ajouter 1 ml de milieu d'aspiration. Mélanger délicatement. Transférer la suspension au milieu de la grande boîte de Pétri et rincer le tube deux fois avec 2 ml de milieu d'aspiration
4. Faire tourner la boîte plusieurs fois pour aplatir la goutte et répartir uniformément le sédiment Laisser reposer la boîte pendant environ 2 minutes afin que le les ovocytes puissent couler au fond
5. Placer la boîte de Pétri sous le microscope et commencer à prélever les complexes cumulus-ovocytes (CCO) avec une pipette de 20 µl

Remarque : *une recherche et une sélection longues et approfondies peuvent être contre-productives ; cela peut compromettre la qualité de tous les ovocytes prélevés.*

Une recherche et une sélection ciblées et rapides des ovocytes basées uniquement sur le placement du cumulus (2-3 couches compactées de cellules du cumulus tout autour) sont recommandées.

Les irrégularités cytoplasmiques, à moins qu'elles ne soient extrêmes, doivent être ignorées.

5



6. Placez les ovocytes récupérés dans l'une des petites boîtes de Pétri

   Lorsque tous les ovocytes ont été recueillis dans cette boîte, déplacez-les dans l'autre petite boîte, tout en les comptant. En faisant cela, les ovocytes seront lavés

7. Après cela, les ovocytes peuvent être déplacés dans le boite à 4 puits avec du Bicarbonate IVM. Mettez ≤ 25 CCO dans chaque puits.
8. Incuber dans les conditions décrites ci-dessus
9. Prenez un café et un dessert (pas dans le laboratoire)
10. Préparer le matériel pour demain (voir ci-dessous)

7

4 Préparation du sperme et fécondation *in vitro* (FIV) (Jour 0)

4.1 De quoi avez-vous besoin (pour 100 ovocytes) ?

1. Laboratoire d'embryologie basique, avec une température ambiante de 25 °C (!)
2. Incubateur avec 5 % de CO_2 ou mélange gazeux 5+5+90 %, 38,5°C et humidité maximale
3. Flux d'air laminaire
4. Plaque chauffante, réchauffée à 38,5°C le jour de la collecte des ovocytes
5. Une boîte Nunc à quatre puits (4WD)
6. Milieu VitaVitro IVF
7. Huile de paraffine lourde VitaVitro®
8. Micropipettes de 20-200-1000 µl avec embouts
9. Milieu VitaVitro® de préparation des spermatozoïdes
10. Kit VitaVitro® de gradient de densité du sperme
11. Tubes à centrifuger coniques Falcon de 14 ml avec bouchons en plastique

    23 h après le début de la maturation

12. Stéréomicroscope avec platine chauffée à 38,5°C
13. Centrifugeuse de laboratoire avec rotor pour tubes à centrifuger « bouchon bleu » de 15 ml
14. Pipettes Pasteur en plastique à usage unique
15. Thermos avec de l'eau à 30-35°C
16. Ciseaux stériles
17. Pince à épiler
18. Dewar d'azote liquide pour le stockage avec les paillettes de semences congelées

4.2 Délai de la procédure

Le jour de la collecte des ovocytes	15 min
23 h après le début de la maturation	90 min

4.3 Préparation

Le jour de la collecte des ovocytes

1. Préparer la boîte de FIV : ajouter 400 µl de milieu de FIV dans chaque puits de la boite à quatre puits et recouvrez-le de 400 µl d'huile de paraffine. Incuber pendant une nuit à 38,5°C
2. Placer 10 ml de milieu de préparation des spermatozoïdes dans un tube Falcon de 14 ml.

   Transférez également le contenu des flacons de solution du Gradient 55 % et du Gradient 90 % dans deux tubes Falcon de 14 ml. Fermer hermétiquement les bouchons et incuber les tubes pendant une nuit à 38,5°C

23 h après le début de la maturation

Aucune préparation requise

4.4 Procédure

1. Retirer les tubes des Gradients de densité de l'incubateur.

   À l'aide d'une pipette Pasteur jetable, prélever la solution à 90 % et la mettre dans l'autre tube de Gradient de densité.

   En tenant le tube à un angle de 30 à 45°, touchez la paroi inférieure avec la pointe de la pipette juste au-dessus du niveau de la solution à 55 %, puis relâchez lentement la solution à 90 %. Évitez de faire des bulles et des turbulences. Les deux solutions doivent être séparées avec une ligne très fine mais visible
2. Trouver la paillette avec la bonne semence et la mettre dans un bain-marie à 30-35°C (une paillette pour chaque boite de Maturation 4WD.

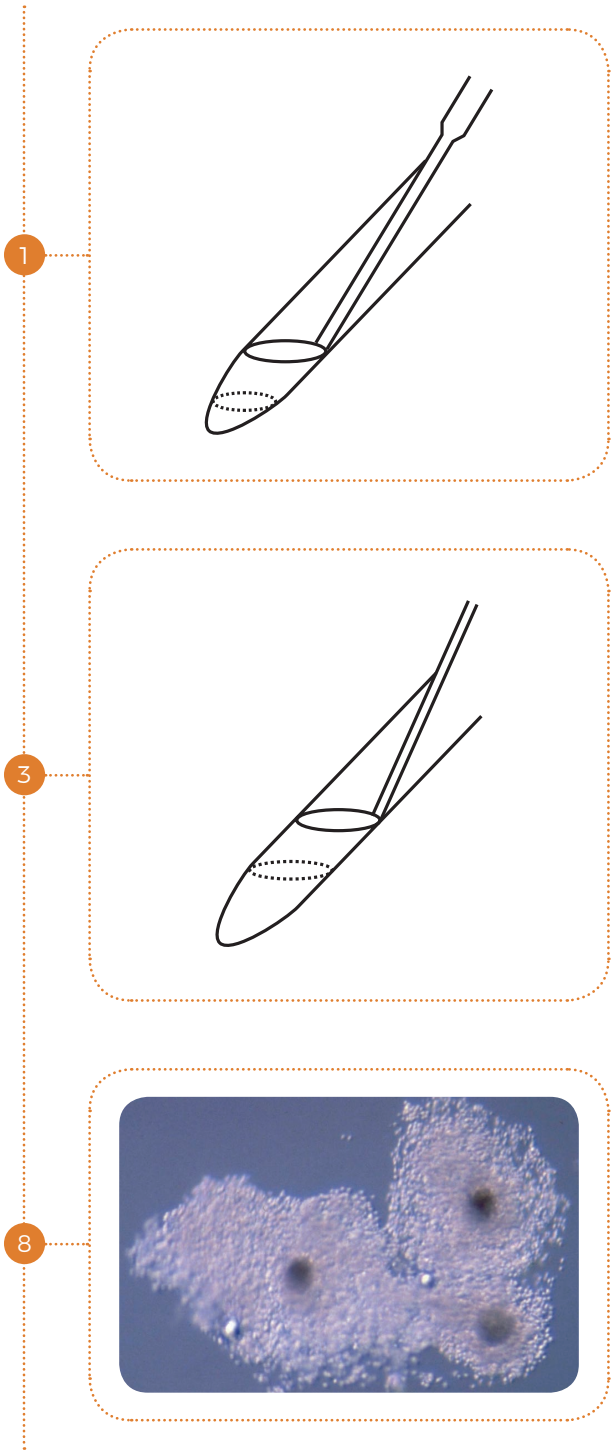
   Attention : *lorsque vous retirez la paillette, utilisez une pince plutôt que vos doigts, pour éviter un "choc thermique" aux spermatozoïdes*

   Laisser les paillettes dans l'eau pendant quelques secondes.
3. Couper la paillette à une extrémité, et déposer cette extrémité ouverte dans le tube de gradient, exactement comme précédemment avec la pipette Pasteur. Couper l'autre extrémité. Laissez le contenu descendre vers le gradient supérieur.

   Faire sortir le plus de semence possible de la paillette.
4. Centrifuger le tube pendant 25 min à 1500 tr/min à température ambiante.
5. Retirer le surnageant avec précaution à l'aide d'une pipette Pasteur jetable
6. Ajouter 4 ml de milieu de préparation des spermatozoïdes, mélanger doucement, puis centrifuger pendant 10 min, 1100 tr/min.
7. Répétez les étapes 5 et 7, mais cette fois-ci centrifugez à 900 tr/min, pendant 10 min.
8. Pendant la deuxième centrifugation, retirez les boites de MIV et de FIV de l'incubateur.

   Attention : *AUCUN lavage ou séparation des complexes cumulus-ovocytes n'est nécessaire.*

   Effectuer le transfert aussi rapidement que possible !

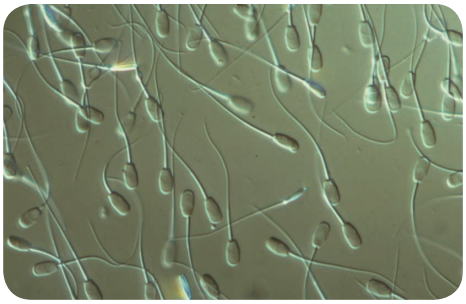


9. Retirer le surnageant du tube de préparation des spermatozoïdes. Ajouter 100 µl de milieu de préparation des spermatozoïdes et remettre le culot en suspension.
10. Ajouter 20 µl de la suspension dans chaque puits de la boite de FIV.

    Incuber pendant 23 heures.

    Remarque : *sauf dans des situations particulières, il n'est pas nécessaire de compter et de déterminer la viabilité d'un lot connu de sperme. La quantité optimale peut différer selon les taureaux et les lots. Cependant, les embryologistes expérimentés peuvent procéder à des ajustements en fonction de l'observation au stéréomicroscope de la suspension de semence. De légères différences dans les quantités ne modifient pas le résultat et ne justifient pas un comptage et des tests de viabilité qui prennent beaucoup de temps.*
11. *Préparer le matériel pour le lendemain (voir ci-dessous)*

9



5 Culture *in vitro* (CIV) des embryons (Jour 1 à 7)

5.1 De quoi avez-vous besoin (pour 100 ovocytes) ?

1. Un laboratoire d'embryologie basique, de préférence avec une température ambiante de 25°C.
2. Un incubateur avec un mélange gazeux de 5+5+90%, 38,5°C et une humidité maximale.

   Remarque : *pour les CIV, un incubateur avec une atmosphère à faible teneur en oxygène est INDISPENSABLE !*
3. Flux d'air laminaire, activé uniquement pendant les étapes de préparation.
4. Stéréomicroscope avec une platine chauffée à 38,5°C.
5. Plaque chauffante, chauffée à 38.5°C
6. Vortex robuste, avec support en caoutchouc rigide, capable d'effectuer des vibrations agressives.
7. Une boite Nunc à quatre puits
8. Deux petites boîtes de Pétri en plastique (33 mm de diamètre)
9. Un tube Falcon conique à centrifuger de 14 ml avec bouchons en plastique
10. Grand tube conique Eppendorf (1,8 ou 2 ml)
11. Milieu unique VitaVitro IVC avec ou sans FCS (voir Addendum)
12. Huile de paraffine lourde VitaVitro®
13. VitaVitro TCM-HEPES
14. Micropipettes de 20-200-1000 µl avec embouts

5.2 Durée de la procédure

Le jour de la fécondation	15 min
23 h après le début de la fécondation	30 min

5.3 Préparation

Le jour de la fécondation

1. Préparer la boite de CIV : ajouter 400 µl de milieu IVC dans les puits 1 et 2 de la boite à quatre puits, puis les recouvrir de 400 µl d'huile de paraffine. Incuber toute la nuit à 38,5°C.
2. Placer 7 ml de TCM-HEPES VitaVitro® dans un tube Falcon de 14 ml, fermer le bouchon hermétiquement, et incuber pendant la nuit à 38,5°C.

23 h après le début de la FIV

Aucune préparation requise

5.4 Procédure

1. Ajouter 400 µl de TCM HEPES dans le tube Eppendorf.
2. Ajoutez 5 ml (!) de TCM HEPES dans la première petite boîte de Pétri, en laissant la seconde vide.
3. Avec la micropipette de 100 µl (de préférence avec un seul prélèvement dans les quatre puits), retirer les zygotes présomptifs de la boîte FIV et les mettre dans le tube Eppendorf.
4. Agiter au Vortex avec la vitesse maximale pendant 2 min[2]

   Remarque : *e temps requis dépend de la puissance des machines Vortex.*

   Le résultat doit être l'absence de cellules du cumulus à la surface des embryons. Autrement, vous devez répéter/ prolonger le vortex ou ajouter 1 à 2 µl d'huile de paraffine dans le tube Eppendorf.

   Les gouttes d'huile dispersées peuvent aider à retirer mécaniquement les cellules du cumulus fortement attachées.

   Veuillez également noter qu'en suivant PRÉCISÉMENT les étapes suivantes, vous pouvez procéder très rapidement - c'est essentiel pour obtenir un bon résultat.
5. Avec la micropipette de 1000 µl (ajustée à 1000 µl), retirer le contenu du tube Eppendorf et le placer dans la deuxième petite boîte de Pétri (vide).
6. Retirer 1000 µl du milieu de la première boîte de Pétri, l'ajouter au tube Eppendorf, mélanger avec la pipette, retirer, ajouter à la deuxième boîte de Pétri.
7. Répéter l'étape 6.
8. Après 10 à 20 secondes (nécessaires pour que les embryons coulent au fond), faire tourner la boîte d'un mouvement circulaire prudent pour recueillir les zygotes présumés au centre de la boîte.
9. Les transférer dans la première boîte de Pétri, de préférence en une seule prise à l'aide de la micropipette de 20 µl. Les disperser uniformément dans la boîte.
10. Après 10 à 20 secondes, avec un tourbillonnement limité, recueillir les zygotes au niveau du tiers central de la boîte.

    Recueillir rapidement 50 zygotes et les transférer dans le puits 1 de la boite de CIV. Répéter le prélèvement et transférer les zygotes restants dans le puits 2
11. Incuber jusqu'à 7 jours sans interruption.

    Remarque : *MÊME CONTRÔLE VISUEL LE PLUS COURT DURANT LES JOURS 1 À 6 COMPROMETTRA le développement ! (Pour des raisons pratiques - arrangement du transfert d'embryon - vous pouvez vérifier les embryons le jour 6 après-midi).*

CHAPITRE II. CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS BOVINS PRODUITS *IN VITRO*

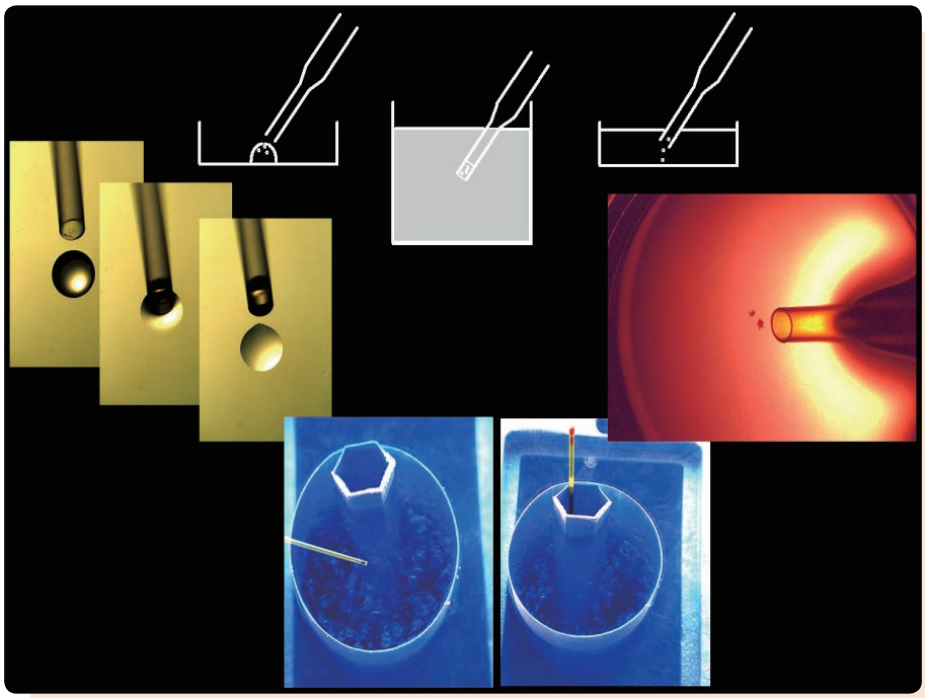
Dans le titre, on pourrait remplacer cryoconservation par *vitrification*, car notre chapitre ne traitera pas de la congélation traditionnelle. Contrairement à la FIV humaine, la vitrification est un concurrent sérieux de la congélation traditionnelle depuis le commencement de la production *in vitro* des embryons bovins, disons au début des années 90. Contrairement à leurs homologues humains, les embryons bovins nécessitent une période de culture prolongée de sept jours pour un transfert réussi. Au début des années 90, nos milieux de culture et nos méthodes étaient inadaptés, aboutissant à des blastocystes de qualité inférieure avec un cytoplasme sombre dû à l'accumulation de lipides et d'une capacité de développement compromise. Bien que des gestations et des naissances aient pu être obtenues, la cryotolérance de ces embryons était inférieure au niveau minimum requis de congélation traditionnelle, les chercheurs ont donc été pressés de trouver une solution alternative.

La vitrification était une possibilité raisonnable, car les lésions causées par le froid (dommages survenant à des températures en dessous de +14°C ; Martino et al., 1996) étaient particulièrement nocives pour ces structures riches en gouttelettes lipidiques.

Les taux de refroidissement relativement élevés (bien que très différents avec ceux que l'on peut atteindre aujourd'hui) ont contribué à réduire les dommages causés par le froid et à améliorer les résultats ultérieurs. Cependant, l'application de la vitrification - ainsi que celle de toute la procédure de FIV bovine - était principalement limité à l'utilisation en laboratoire pendant des décennies. Ce retard regrettable a été provoqué par une seule raison pratique - et discutable, ou plutôt fausse.

Le prélèvement intravaginal d'ovules guidés par ultrasons, suivi d'une fécondation in vitro (OPU-FIV) chez les bovins, a été décrit dès 1991 (Pieterse et al., 1991), mais l'application à l'échelle industrielle n'a été lancée que dix ans plus tard, au tournant du millénaire, avec la rationalisation de la technologie et en l'adaptant aux exigences de l'application à la ferme. Parallèlement, en raison des nouveaux milieux et une atmosphère pauvre en oxygène, la qualité des embryons produits *in vitro* a également augmenté de manière significative. Finalement, la différence entre la morphologie des embryons produits in vitro par rapport à ceux produits vivo a été presque entièrement éliminée, avec une amélioration significative des taux de gestation/vêlage et de cryotolérance. Par conséquent, la congélation lente traditionnelle est redevenue un choix, même si les résultats étaient encore variables ; en général, inférieurs aux attentes. Par conséquent, environ 80 % des embryons sont transférés sans cryoconservation dans le monde (Ferré et al., 2019) avec tous les problèmes logistiques et les handicaps liés aux transferts frais dans les applications à l'échelle industrielle.

Entre-temps, la recherche sur la vitrification a également connu des améliorations spectaculaires. Les outils porteurs spécialement conçus à cet effet ont permis de décupler ou de centupler les taux de refroidissement et de réchauffement, éliminant pratiquement les lésions dues au froid et permettant également une diminution radicale de la concentration des solutions cryoprotectrices potentiellement dangereuses. Après une longue période d'hésitation, la vitrification est devenue un choix évident dans la FIV humaine, tant pour la cryoconservation des embryons que des ovocytes, limitant l'utilisation des congélateurs traditionnels aux gamètes mâles.



Curieusement, dans la FIV bovine, où les premiers succès ont été obtenus avec la vitrification à grande vitesse, ces améliorations ont été complètement négligées. L'application à la ferme nécessite une procédure simple de décongélation-réchauffement et de transfert, sans avoir besoin d'équipement de laboratoire, de microscopes, de vaisselle et d'air filtré. Pour répondre à ces exigences, le transfert direct après dilution des cryoprotecteurs dans la paillette était une méthode établie dans la congélation traditionnelle, mais était/est généralement considéré comme impossible après la vitrification.

Cependant, il existe une procédure simple et efficace de transfert direct après vitrification. Le principe a été suggéré par le légendaire scientifique vétéran de la reproduction animale, le Dr Clifton Murphy (Missouri, États-Unis), basé sur le premier outil de vitrification à grande vitesse, l'Open Pulled Straw (OPS; Vajta et al., 1998) qui a été publié il y a 23 ans (Vajta, Murphy, Macháty et al., 1999). Bien que mentionnée à plusieurs reprises dans les revues, les manuels et les conférences, l'application de cette procédure a été limitée à un cercle très étroit de scientifiques et utilisée principalement pour le transfert de blastocystes clonés et ceux dépourvus de la zone pellucide. D'autre part, même les résultats limités obtenus avec ces embryons sensibles prouvent clairement la valeur de cette technologie.

Bien que d'autres moyens de relier la vitrification au transfert direct par l'utilisation de différents outils aient été décrits récemment, ces méthodes ne présentent ni l'avantage essentiel du refroidissement et du réchauffement à grande vitesse, ni la robustesse et la fiabilité de la technologie liée à l'OPS.

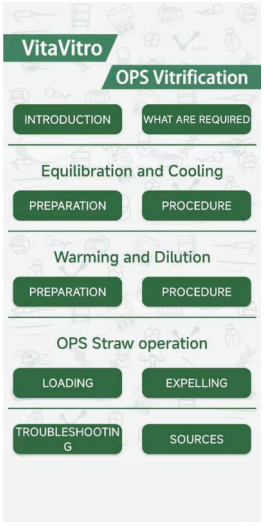
Ce chapitre est une autre tentative - peut-être l'ultime – d'éliminer cette controverse, de présenter les possibilités et d'offrir une de méthodes simples, rapides et pratiques pour une application à grande échelle, voire industrielle, de la vitrification des embryons bovins produits *in vitro*.

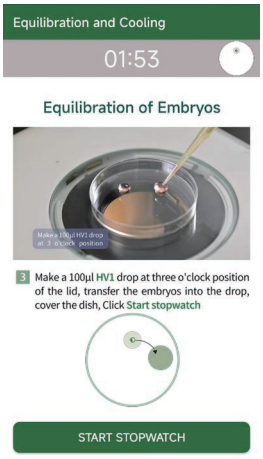
1 Vitrification : équilibrage, déshydratation, refroidissement et stockage

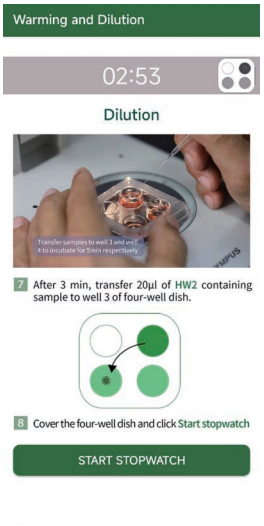
Comparé à la FIV humaine, les quantités en embryologie bovine peuvent être importantes, tandis que les ressources financières et humaines sont moins abondantes. Par conséquent, il est préférable d'utiliser des procédures simples et courtes nécessitant moins de produits jetables et de solutions. Une autre exigence est la flexibilité en ce qui concerne le nombre d'embryons à vitrifié au cours d'un seul cycle en se servant du même outil de support. Cette facilité permet d'employer la même technique à la fois pour le transfert (direct) d'un seul embryon à la ferme et pour le stockage à grande échelle à des fins de laboratoire/expérimentales. La technologie OPS utilisée pour la vitrification des blastocystes J5 humains peut également être appliquée avec succès pour les blastocystes bovins produits in vitro (brièvement : 9 à 15 minutes d'équilibrage, 2 x 20 s de déshydratation, les deux à 25 °C, chargement, refroidissement ; voir les renseignements détaillés dans l'application OPS de VitaVitro® pour les téléphones iOS et Android).

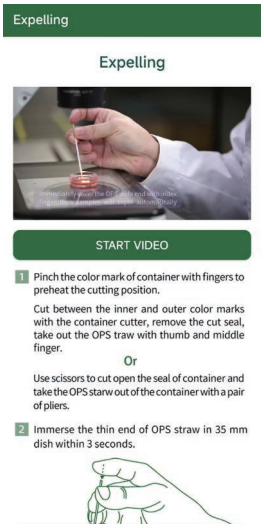
iOS

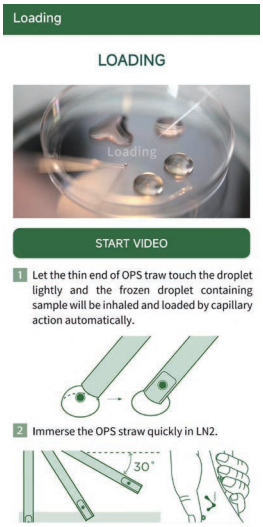
Android











Cependant, une technologie alternative (en fait, la technologie originale) de l'OPS décrite ci-dessous pourrait offrir plus d'avantages aux embryons bovins tout en préservant tous les avantages de la vitrification OPS. En outre, cette technologie a été appliquée avec succès à tous les stades du développement entre J3 et J8 sans perte de viabilité et de compétence de développement.

1.1 De quoi avez-vous besoin ?

1. Laboratoire d'embryologie avec air pur et des équipements/outils de base pour la fécondation *in vitro* bovine.

   Les hottes stériles ne sont PAS nécessaires pour la vitrification – si utilisée, le ventilateur doit être éteint.

   La température ambiante n'est pas cruciale, comme la procédure proposée est exécutée dans un environnement chauffé.

2. Une paillasse séparée utilisée uniquement pour la cryoconservation, avec TOUS les éléments requis et UNIQUEMENT les éléments nécessaire à la cryoconservation.

3. Un stéréomicroscope avec platine chauffante et une grande plaque chauffante plate, toutes deux ajustées à 38,5°C

4. Boîtes de rangement en plastique semi-transparent pour couvrir les boites de culture sur la paillasse et sur la plaque

5. VitaVitro Open Pulled Straw (OPS)

6. VitaVitro Container Straw - une paillette en plastique de 0,5 ml modifiée pour un stockage sans contamination des échantillons dans l'azote liquide. (réf.DA08001)

6a. ou tubes de stockage VitaVitro OPS avec parois et bouchons perforés pour le stockage non stérile des OPS (réf. DA08007)

7. VitaVitro Cooling Box pour un refroidissement sûr et un emballage dans les VitaVitro Container Straw

   Décontaminer avant utilisation avec de l'éthanol à 70%, du H_2O_2 ou des désinfectants de laboratoire.

   Placer sur une table séparée ou sur le meuble de rangement à 15-20 cm sous le niveau la paillasse (pour éviter un refroidissement accidentel de la paillasse par la vapeur de l'azote liquide) sur le côté gauche de votre chaise (pour les embryologistes droitiers).

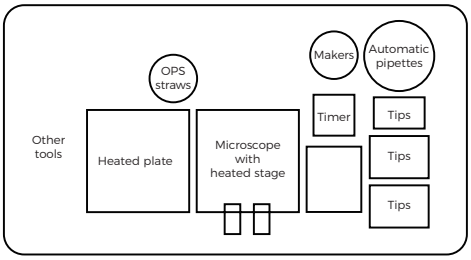
7a. ou une boîte en polystyrène robuste (≈ 25 x 15 x 15 x 5 cm) avec des parois d'au moins 3 cm d'épaisseur et un couvercle

   Décontaminer avant utilisation avec de l'éthanol à 70%, du H_2O_2 ou des désinfectants de laboratoire.

   Placer sur une table séparée ou sur le meuble de rangement à 15-20 cm sous le niveau la paillasse (pour éviter un refroidissement accidentel de la paillasse par la vapeur de l'azote liquide) sur le côté gauche de votre chaise (pour les embryologistes droitiers).

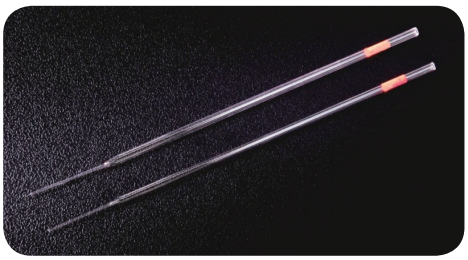
8. Gobelets en plastique pour le stockage de la paillette dans l'azote liquide, de 65 et 15 mm de diamètre, respectivement (de votre fournisseur local)

2



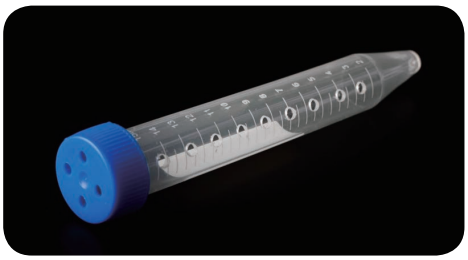
4

5



6

6a



7

9. Micropipettes de 20-200-1000 µl (de votre marque préférée) avec embouts stériles
10. Pipette de manipulation/transfert d'embryons (votre marque préférée)
11. Boite à quatre puits (4WD) pour la vitrification et le réchauffement (Nunc, Roskilde, Danemark)
12. Grandes pinces de laboratoire émoussées (de votre fournisseur local)
13. Thermoscelleuse VitaVitro® pour paillettes (cat. N° VOPS01)
14. Denudeur de câble (votre marque préférée)

14a. *ou ciseaux chirurgicaux droits (stitch) en acier inoxydable (de votre fournisseur local)*

15. Pince à dissection fine à petites griffes de chez VitaVitro®
16. Minuteur (de préférence Jadco Electronic Clock-Timer)
17. Stylo marqueur à pointe fine, bleu et rouge (de préférence Thermo Scientific Cryo Marker Pen Set)
18. Papier et stylo pour prendre notes
19. Kits de solutions de vitrification et de réchauffement VitaVitro®

13

14

15

16

1.2 Timeframe

Préparation (y compris le réchauffement des boites et des solutions)	30 à 40 min
Un cycle dans un OPS (pour 1 à 5 embryons/paillette)	6 min / paillette voir 1.4
Cycle parallèle en deux OPS (pour 1 à 5 embryons/paillette)	4 min / paillette voir 1.5

1.3 Préparation

1. Réchauffez les bouteilles réfrigérées de CHM, CV1, CV2 sur la plaque chauffante à 39°C, sous une boîte en plastique ou dans un incubateur de type boîte à 38,5°C pendant 30 min ; ou dans un bain-marie à 38,5°C pendant 20 min.

   Pendant ce temps, placez une 4WD sur la plaque chauffante et couvrez-le avec une autre boîte en plastique.

1

2. Ajouter le CHM aux puits 1 et 2 ; CV1 au puits 3 ; et CV2 au puits 4

   La quantité requise dépend du nombre de cycles pour 1 à 2 paillettes (ou 1 à 2 x 2 paillettes parallèles) 450 µl chaque puits

   pour 3 à 6 paillettes (ou 2 x 3 à 6 paillettes parallèles) 900 µl chaque puits

   (pour plus de 6 paillettes, il faut préparer une nouvelle 4WD)

   Ne recouvrez pas les solutions d'huile !

   Réchauffer la boite pendant 5 min supplémentaires sur la plaque chauffante, sous une boite en plastique

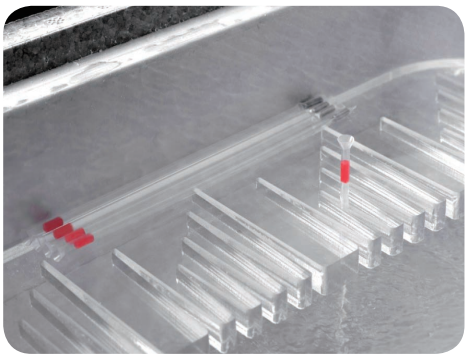
3. Pendant ce temps, remplissez la VitaVitro Cooling Box (ou la boîte en polystyrène) d'azote liquide.

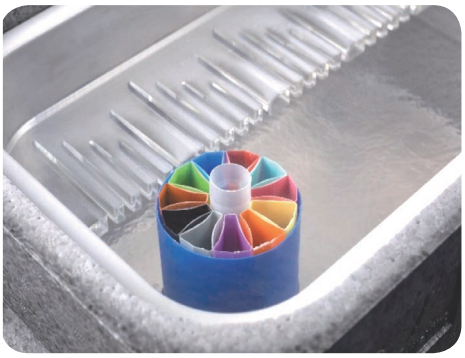
   Ajouter le gobelet en plastique de 65 mm avec les petits gobelets colorés de 15 mm dans la VitaVitro Cooling Box pour un stockage stérile ou utiliser les tubes de stockage VitaVitro OPS dans la boîte en polystyrène pour un stockage non stérile

   Fermer le couvercle de la boîte de stockage

   Gardez le Dewar de stockage dans le laboratoire pour le remplissage

3





1.4 Procédures

Voir aussi la vidéo : https://vimeo.com/773294173 (certains détails - y compris la boîte de refroidissement - sont différents)

Remarque : *Le nombre maximal d'embryons à vitrifier dans un OPS dépend des besoins et de l'expérience du praticien. Initialement, seulement 1 ou 2 embryons sont proposés.*

L'équilibrage et la déshydratation sont des processus dépendant de la température. Le réchauffement insuffisant des solutions et des boites peut compromettre les résultats. L'utilisation de solutions à la température corporelle des bovins peut permettre de raccourcir radicalement le temps d'équilibrage et de déshydratation. Cependant, à cette température, l'évaporation peut causer une augmentation de l'osmolalité des solutions et une altération des échantillons.

Bien que seule une petite partie de CV2 soit utilisée pour l'étape finale de déshydratation, la grande quantité suggérée maintient la température et l'osmolalité requises. Toutefois, plus de six cycles distincts (ou plus de 40 min de temps de travail au total) peut entraîner une évaporation importante et des résultats altérés.

Veuillez noter : *pour le stockage stérile dans des paillettes VitaVitro® Container Straw: avant de retirer les embryons de l'incubateur, mettrez le nombre requis de paillettes de stockage (une pour chaque paillette OPS) horizontalement sur le support de la glacière « VitaVitro Cooling Box ». Allumer la thermoscelleuse.*

Remarque : *cette description a été faite pour les droitiers. Les collègues gauchers peuvent préférer une image miroir de l'arrangement décrit.*

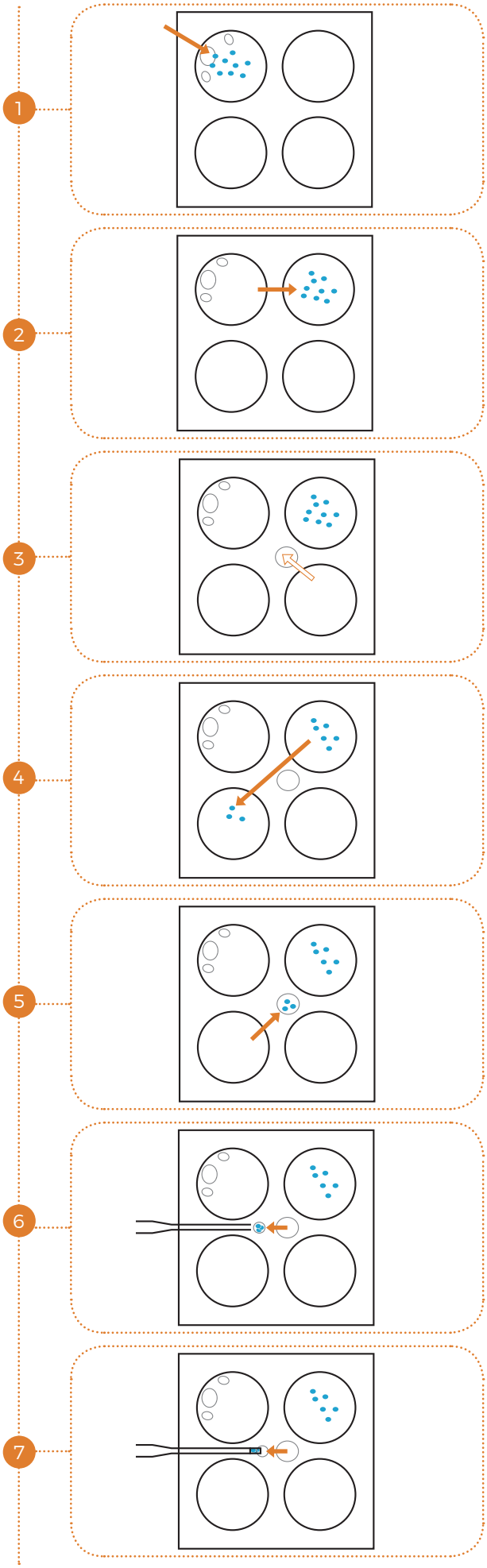
1. Récupérer tous les embryons à vitrifier dans la boite à quatre puits (4WD) et les mettre dans le puits 1 ; éviter de transférer une quantité excessive d'huile
2. Attendez que tous les embryons coulent au fond, puis les prélever tous et les mettre dans le puits 2; éviter transfert d'huile
3. Mettre une goutte de 20 µl de CV2 (puits 4) dans la partie inférieure droite du centre de la boite 4WD

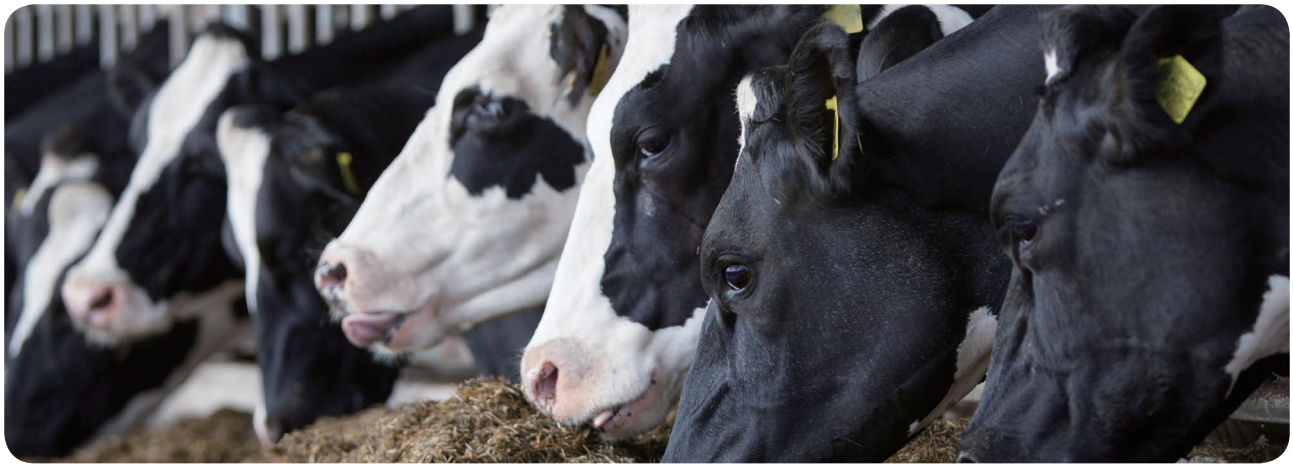
   Pour le stockage stérile, mettre une paillette de stockage « VitaVitro Container Straw » verticalement, l'extrémité de l'entonnoir vers le haut, dans une fente du support de la glacière « VitaVitro Cooling Box ».
4. Transférer 1 à 5 embryons dans le CV1 (puits 3) le plus faible volume possible de milieu. Lorsque ils sont immergé dans CV1, aspirer d'abord env. 10 µl dans la pipette, puis faire sortir lentement les embryons. Essayer de les maintenir ensemble et au fond du puits

   Garder les embryons ensemble au fond de la boite autant que possible. Fermez le couvercle et équilibrer pour un total de 3 min sous une boîte en plastique
5. Tenir la OPS avec la main gauche, mais évitez de fermer l'extrémité épaisse avec votre doigt.

   Transférer les embryons dans le plus petit volume possible de la goutte de 20 µl de CV2.

   Lorsqu'ils sont immergés dans la gouttelette, aspirer d'abord env. 10 µl de la solution dans la pipette, puis expulser rapidement les embryons
6. Aspirer de nouveau, expulser, répéter pendant environ 40 secondes. Puis prélever les embryons dans un volume de 2 µl et faire une petite gouttelette bombée, légèrement à gauche du centre de la boite 4WD
7. Immédiatement après, toucher le côté gauche de la gouttelette avec l'OPS, extrémité étroite, maintenue à un angle d'environ 30° par rapport au fond. Ne pas fermer l'extrémité large de l'OPS. Un cylindre d'environ 1 mm de haut de CV2 contenant tous les embryons doit être formé à l'extrémité de la paillette.





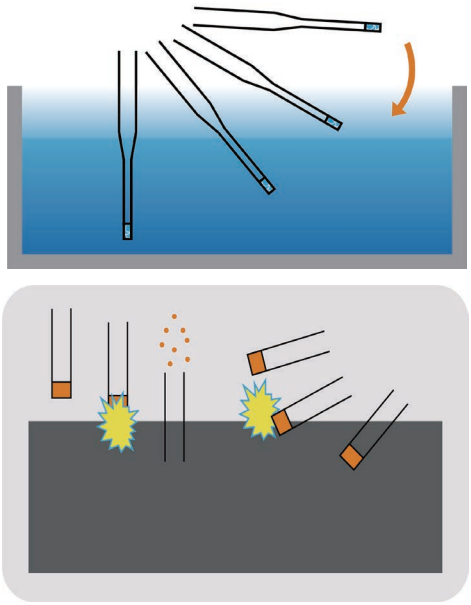
8. D'un seul mouvement rapide et ininterrompu, en faisant passer la paillette de la position horizontale à la position verticale et en traversant rapidement la vapeur, introduire l'extrémité étroite de l'OPS dans l'azote liquide.

   Remarque : *si vous touchez la surface en position verticale, la vapeur de l'azote liquide, générée par la chaleur VS2, pourrait exploser le VS2 et éjecter les échantillons.*

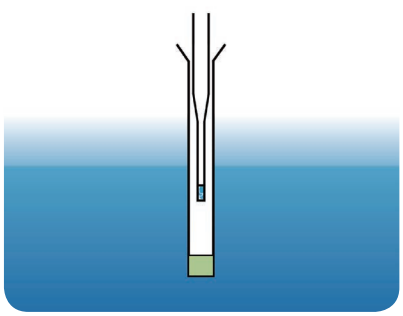
   Veuillez également noter : *le temps total entre le transfert dans la goutte de 20 µl et l'immersion dans l'azote liquide ne doit pas dépasser 1 min*

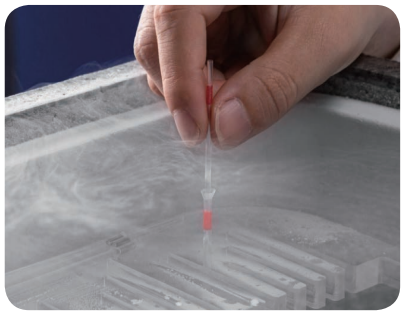
9. Après 10 secondes, insérer l'OPS dans la paillette de stockage pré-refroidie, puis scellez à chaud l'extrémité de l'entonnoir après insertion ou mettre dans le tube de stockage OPS, puis fermer le tube avec le capuchon bleu perforé.

8



9





10. Recommencez la procédure en transférant les nouveaux embryons du puits 2 au puits 3.

    Remarque : *Avant chaque nouveau cycle de vitrification, changez le milieu dans la gouttelette de 20 µl en utilisant le même endroit sur le fond. D'autre part, la petite goutte utilisée pour le chargement doit toujours être faite sur une nouvelle zone pour éviter la formation de gouttes plates.*

1.5 Procédure de vitrification accélérée avec équilibrage parallèle

Remarque : *Cette approche est suggérée uniquement pour embryologistes expérimentés en vitrification OPS.*

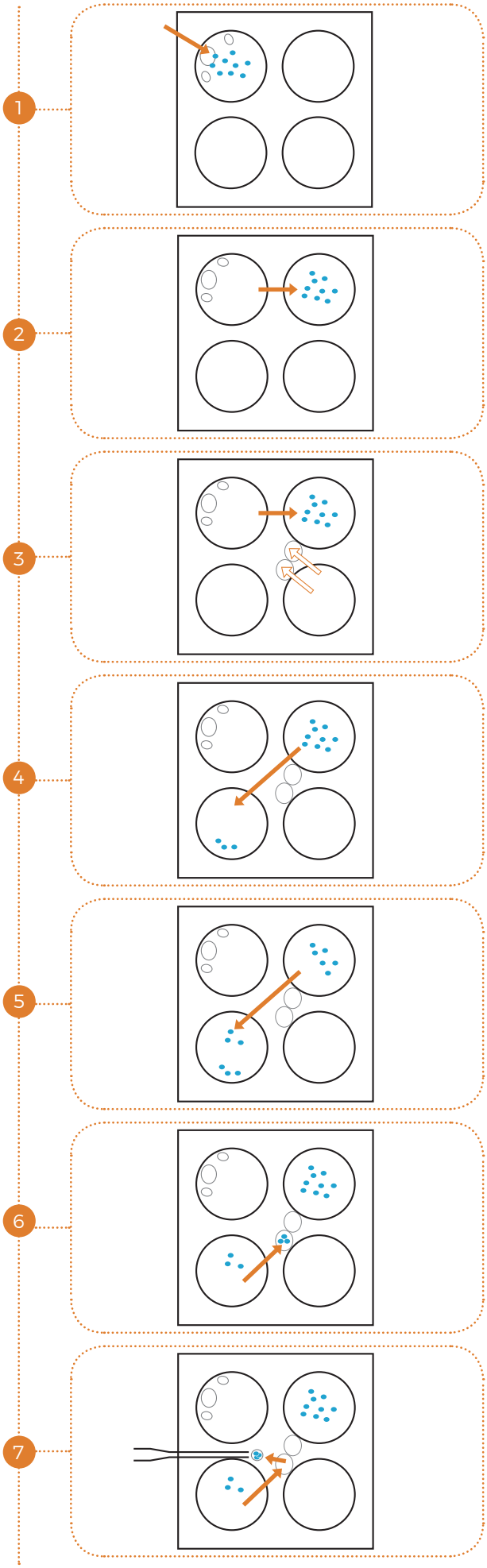
L'utilisation de la boîte de la glacière « VitaVitro Cooling Box » et des paillettes de stockage « Container Straws » est recommandé.

1. Récupérer tous les embryons à vitrifier dans boite à quatre puits donnée et les mettre dans le puits 1 ; éviter de transférer une quantité excessive d'huile
2. Attendre que tous les embryons coulent au fond, puis les prélever tous et les mettre dans le puits 2; éviter de transférer d'huile
3. Préparer deux gouttes de 20 µl à partir de la CV2 (puits 4) près du centre, au côté droit du fond de la boite 4WD.

   Placer verticalement deux paillettes récipients, extrémité de l'entonnoir vers le haut, dans deux fentes du support de glacière VitaVitro®.
4. Transférer de 1 à 5 embryons dans le CV1 (puits 3) avec le plus faible volume possible de milieu. Lorsque immergé dans le CV1, aspirer d'abord environ 10 µl dans la pipette, puis faire sortir les embryons lentement. Essayez de les garder ensemble au fond du puits, quadrant sud
5. 90 secondes après le début de l'équilibrage du premier groupe, répéter la procédure avec le deuxième groupe, en les maintenant ensemble au fond du puits, quadrant nord
6. Tenir l'OPS avec votre main gauche en évitant de fermer l'extrémité épaisse avec votre doigt

   3 minutes après le début de l'équilibrage du premier groupe (Sud), transférez les embryons dans le plus petit volume possible dans la première gouttelette de 20 µl de CV2

   Une fois immergés dans la gouttelette, aspirez d'abord environ 10 µl de la solution dans la pipette, puis pousser rapidement les embryons vers l'extérieur
7. Aspirer à nouveau, expulser, répéter, puis prélever les embryons dans un volume de 2 µl et mettre une petite gouttelette bombée, légèrement à gauche du centre du fond du de la boite à quatre puits Immerse the straw into the LN_2: first almost horizontal, then turning vertical with a single rapid movement, passing quickly through the LN_2 vapour

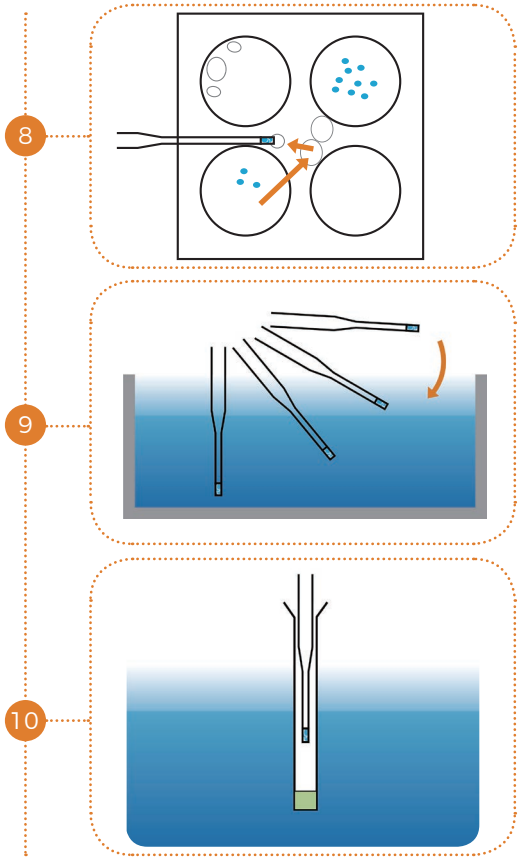


8. Immédiatement après, touchez le côté gauche de la gouttelette avec l'OPS, extrémité étroite, tenue à un angle de 30° par rapport au fond. Un cylindre de CV2 d'environ 1 mm de hauteur contenant tous les embryons doit être formé
9. Plonger la paillette dans l'azote liquide : d'abord presque à l'horizontale, puis en tournant à la verticale d'un seul mouvement rapide, en passant rapidement dans la vapeur de l'azote liquide

   Attention : *si vous touchez la surface en position verticale, la vapeur de l'azote liquide, générée par la VS2 chaude, pourrait exploser le VS2 et éjecter les échantillons.*

   Veuillez également noter que : le temps total entre le transfert dans la goutte de 20 µl et l'immersion dans le l'azote liquide ne doit pas être supérieur à 1 min.
10. Après 10 secondes, insérez l'OPS dans la VitaVitro Container Straw positionnée verticalement.

    Sceller l'extrémité à l'aide de la thermoscelleuse.
11. Immédiatement après, répéter les étapes 5 à 8 avec le second groupe (puits 3, quadrant nord).
12. Recommencer la procédure avec le transfert de nouveaux embryons du puits 2 au puits 3



Attention : *avant chaque nouveau cycle parallèle de vitrification, changer le milieu dans les gouttes de 20 µl en utilisant le même endroit sur le fond. D'autre part, la petite goutte utilisée pour le chargement doit toujours être faite sur une nouvelle zone pour éviter la formation de gouttes plates.*

Remarque : *une accélération supplémentaire de l'efficacité peut être obtenue en ajoutant un troisième et un quatrième cycle parallèle à la chaîne - cependant, cela requiert des compétences et une attention particulières.*

D'autre part, si des problèmes techniques surviennent pendant le travail, le temps d'équilibrage en CV1 peut être prolongé à 4 ou 5 min sans effet significatif sur le résultat.

2 Réchauffement et réhydratation au laboratoire des embryons bovins vitrifiés dans les OPS

2.1 Durée de la procédure

Preparation (including warming dishes and solutions)	30 to 40 min
One OPS straw (for 1 to 5 embryos/straw)	20 min

2.2 Péparation

1. Réchauffer les bouteilles réfrigérées de CW1, CW2 et CHM sur la plaque chauffante à 39°C, sous une boîte en plastique ou dans un incubateur de type boîte à 38°C pendant 30 min ; ou dans un bain-marie à 38.5°C pendant 20 minutes.

   Pendant ce temps, placer une 4WD sur la plaque chauffante et le recouvrir d'une autre boîte en plastique.
2. Ajouter CW1 aux puits 1 et 2 ; CW2 au puits 3 ; et CHM au puits 4 ; 900 µl chacun.

   Réchauffer la boite pendant 5 min supplémentaires sur la plaque chauffée sous une boîte en plastique.
3. Pendant ce temps, remplir la VitaVitro® Cooling Box (*ou la boîte en polystyrène*) avec de l'azote liquide ;

   Ajoutez les gobelets en plastique colorés pour contenir les paillettes d'embryons vitrifiés. Fermer le couvercle.

   Conservez le Dewar de stockage d'azote liquide dans le laboratoire pour le remplir à nouveau.

2.3 Procédures

Remarque : *l'ensemble du processus de réchauffement est identique à celui utilisé pour les ovocytes/embryons humains et bien illustré sur l'application OPS (cf. QR code à la page 24)*

La seule différence est que vous devez réchauffer l'échantillon dans le puits 1, au lieu d'une boîte de Pétri séparée.

Comme il n'y a pas de temps pour suivre les dessins séquentiels pendant ce processus, nous vous suggérons de voir ces liens avec les photos ci-dessous, et de pratiquer la procédure avant ***de commencer à l'utiliser pour matériel vivant.***

Attention : *Pendant toute la procédure, évitez de tenir l'extrémité large ou l'OPS vers vos yeux.*

L'évaporation de l'azote liquide peut éjecter des microgouttes d'azote liquide et causer des dommages.

1. Placer le puits 1 de la 4WD le dans le point focal du microscope. Utiliser un faible grossissement, en couvrant le puits
2. Après un stockage stérile dans des tubes Container VitaVitro®, en utilisant le coupe-paillette VitaVitro®, couper la VitaVitro Container Straw de 2 cm sous le niveau de la fin de l'extrémité épaisse de l'OPS.

   Retirer le bouchon scellé-coupé et saisir l'extrémité large avec le pouce et le majeur de votre main droite

   L'EXTRÉMITÉ ÉTROITE DE L'OPS CONTENANT LES

   ÉCHANTILLONS DOIT RESTER SOUS LE NIVEAU DE L'AZOTE LIQUIDE !

   Vous pouvez également utiliser une paire de ciseaux pour couper la VitaVitro Container Straw sur l'extrémité épaisse de l'échantillon.

   Attrapez l'OPS avec la pince à petites griffes et la soulever jusqu'à ce que vous puissiez saisir l'extrémité large avec le pouce et le majeur de votre main droite

   L'EXTRÉMITÉ ÉTROITE DE L'OPS CONTENANT LES

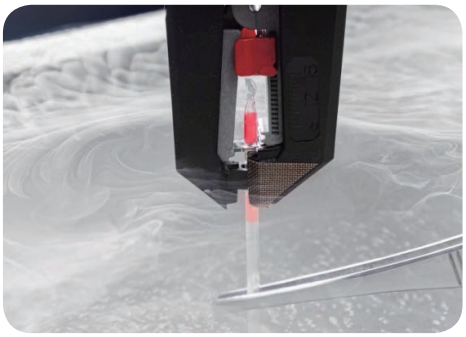
   ÉCHANTILLONS DOIT RESTER SOUS LE NIVEAU DE L'AZOTE LIQUIDE !

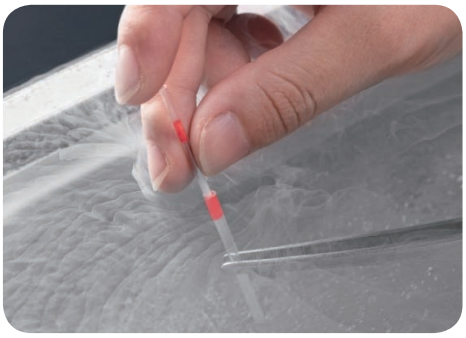
   Après stockage non stérile dans des tubes de stockage OPS VitaVitro®, retirer le bouchon, attraper l'OPS sélectionné à l'aide de la pince à petites griffes et soulever l'OSP jusqu'à ce que vous puissiez saisir l'extrémité large avec le pouce et le majeur de votre main droite

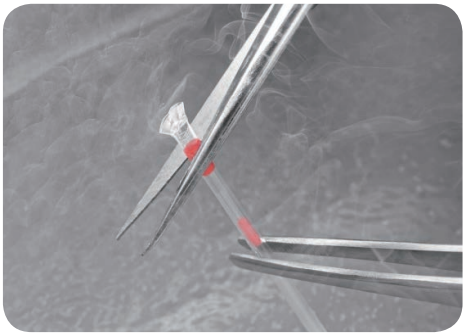
   L'EXTRÉMITÉ ÉTROITE DE L'OPS CONTENANT LES

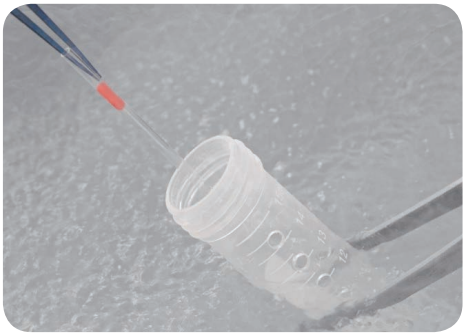
   ÉCHANTILLONS DOIT RESTER SOUS LE NIVEAU DE L'AZOTE LIQUIDE !

2









3. Assurez-vous que la manière dont vous saisissez l'OPS avec votre pouce votre majeur permet une fermeture sûre de l'extrémité large avec votre index ; mais NE FERMEZ PAS l'extrémité encore.
4. Après quelques secondes de concentration, soulevez l'OPS et commencez à compter en vous approchant du puits 1 la boite réchauffée : Un - deux - trois - immerger - fermer. Chacun pendant une seconde
   - à **« trois »**, l'OPS doit être au-dessus de la solution CW1. Observez au microscope
   - au moment de **l'immersion**, descendre l'OPS dans la solution CW1 tout en le en le tenant proche d'une position horizontale

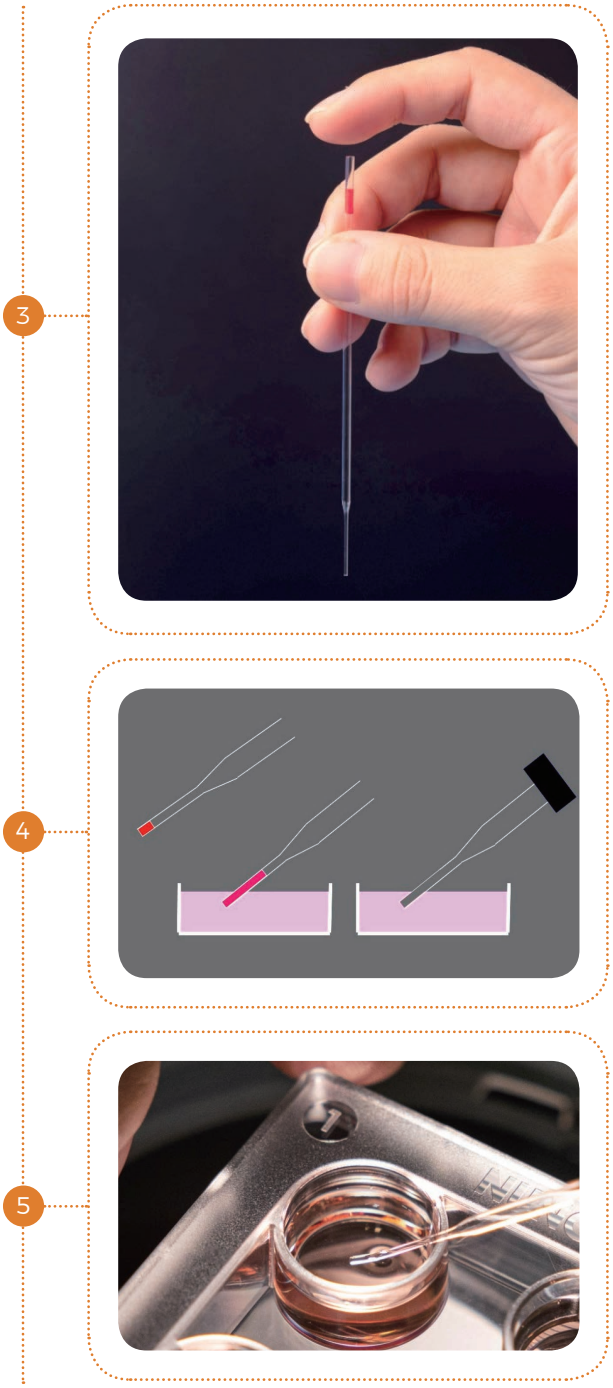
     (Cette position permet un meilleur contrôle visuel et évite l'explosion causée par les traces d'évaporation de l'azote liquide restant)

     Vous verrez un court assombrissement[3] partiel - de la colonne de solution, puis un éclaircissement, et - en raison de l'effet capillaire - la colonne va commencer à se déplacer vers le haut
   - "**Fermez**" immédiatement l'extrémité large avec votre index, et GARDEZ LA FERMETURE SERRÉE.

     La pression croissante de l'air chaud à l'intérieur de l'OPS va pousser la colonne de solution (y compris les embryons) vers l'arrière, et flottera tranquillement dans le CW2
5. Immédiatement après l'expulsion, transférer les embryons dans le puits 2, fermer le couvercle et attendre 5 minutes. Les blastocystes flotteront, puis s'effondreront soudainement

   Et vont couler au fond

   Avec une quantité généreuse de solution (disons 50 µl), transférer les embryons dans le puits 3, et attendre 5 min.



Si la masse cellulaire forme une petite boule aux contours réguliers, le pronostic est bon.

6. Avec une quantité généreuse de solution, transférer les embryons dans le puits 4, et attendre 5 min.
7. La reformation du blastocœle peut commencer dans le puits 4.
8. Transférer dans la boîte de culture

Remarque : *comme mentionné précédemment, il est fortement recommandé de pratiquer d'abord : quelques séries de simulacres de réchauffement et d'expulsion en utilisant uniquement des solutions, puis des embryons dégénérés.*

N'oubliez pas : *vous devez refroidir l'OPS correctement (10-15 min dans de l'azote liquide) pour expulser le contenu avec l'air chaud à l'intérieur.*

3 Réchauffement des embryons bovins après vitrification OPS pour transfert direct

3.1 De quoi avez-vous besoin ?

1. Paillette de transfert direct VitaVitro® (DT)
2. Solution de réchauffement à transfert direct VitaVitro® (DTWS : Milieu de conservation 0,2 M de saccharose)

   Conserver au réfrigérateur et réchauffer à 35-39°C dans la bouteille d'origine avant utilisation
3. Un thermomètre de laboratoire en verre (de préférence 300 mm de long, pour 0-50°C) ou un thermomètre numérique fiable avec une sonde submersible
4. Un bocal isotherme de 400 à 500 ml (de type Thermos Thermocafe)

5. De l'eau chaude et de l'eau froide (de préférence de l'eau stérile).
6. Une table ou un paillasse avec une surface (de préférence) sombre et d'une chaise ajustée à une position commode.
7. Des ciseaux (stérilisés ou décontaminés) pour couper l'extrémité en entonnoir de la paillette DT.
8. Micropipettes de 10 à 100 µl avec embouts

3.2 Délai de la procédure

Préparation	10 min
Procédure	1 min

3.3 Préparation

1. Décontaminer la surface intérieure du bocal, puis le remplir jusqu'à 10 cm de hauteur avec de l'eau à 39°C.

   Contrôler et ajuster la température pendant toute la procédure.
2. Remplir une paillette DT avec du DTWS, en aspirant une colonne d'environ 2,5 à 3 cm du milieu, suivie d'une colonne d'air d'environ 1,5 à 2,0 cm, puis le milieu à nouveau, laissant un espace vide de 0,5 cm à l'extrémité ouverte (entonnoir).

   Placer la paillette DT dans le bocal avec le bout ouvert (entonnoir). Réchauffer pendant 5 min.

3.4 Procédures

(Voir aussi la courte vidéo ici : https://www.youtube.com/watch?v=L8HW30SHL6c)

3. Placer la paillette DT verticalement en face d'une surface sombre et régulière (paillasse, tapis de souris, etc.) afin d'obtenir une meilleure visibilité.

   Tenez-la fermement et appuyez votre main sur le bord du paillasse. Assurez-vous de voir l'extrémité de l'entonnoir à un angle de 45 degrés

4. Retirer l'OPS de l'azote liquide* en la tenant avec le pouce et le majeur. L'index doit être dans une position pratique pour fermer l'extrémité épaisse (plus tard)

   Lorsque l'OPS sort de l'azote liquide, commencer à compter : Un - deux - trois - immerger – fermer Chacun pour une second

   Approcher rapidement l'extrémité en entonnoir de la paillette DT

   **pour un retrait correct du tube de stockage ou du conteneur de paillette, voir les chapitres précédents.*

5. A "**trois**", la DT doit être à l'intérieur de l'entonnoir. Touchez la paroi et avancez lentement

6. À « **immerger** », placez l'extrémité de l'OPS dans le milieu de réchauffement, et immergez la colonne contenant les embryons dans l'OPS

7. En moins de 1 s après l'immersion vous verrez la solution monter dans l'OPS en raison de l'effet capillaire.

   Lorsque vous voyez cela, fermez l'extrémité épaisse de l'OPS avec votre index

   Tenez fermement, ne relâchez pas !

   Si la fermeture est étanche, l'air chaud dans l'OPS va entièrement s'échapper de la solution dans la paillette chaude.

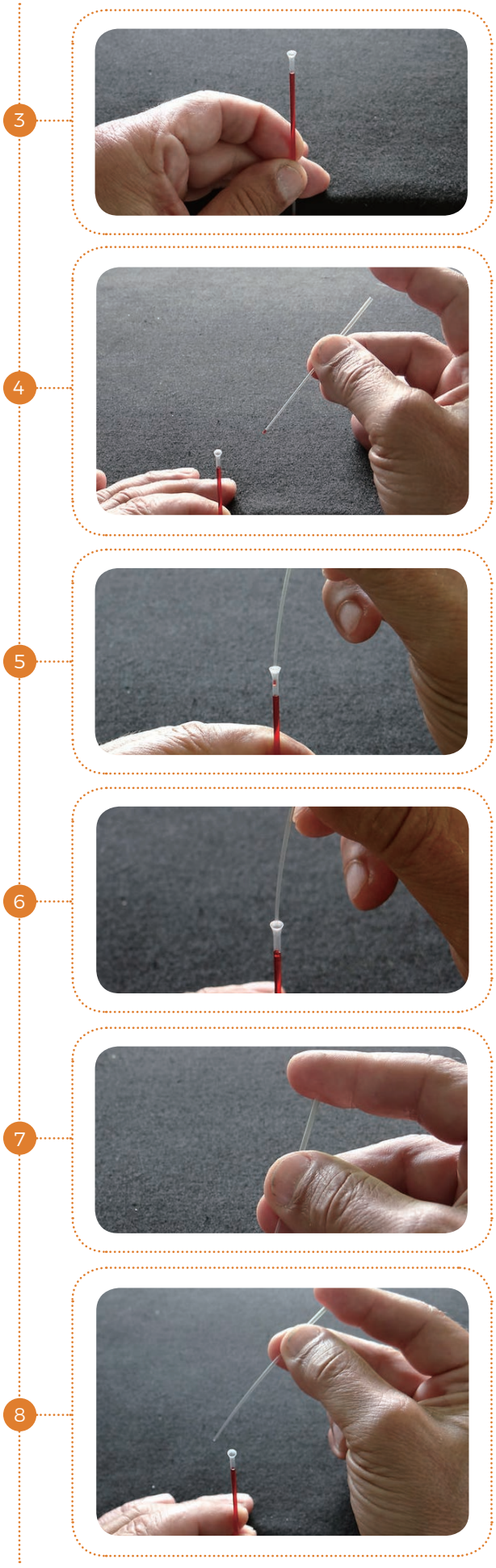
8. Lorsque l'air atteint l'extrémité de l'OPS, il est nécessaire de faire une pause avant que des bulles d'air ne commencent à se former.

   Soulevez et retirez lentement l'OPS de la paillette DT - tout en tenant fermement l'extrémité.

   Maintenir l'extrémité de l'OPS en contact avec la surface intérieure de la paillette DT, cela permet d'éliminer toute la solution - et tous les embryons - de l'OPS.

   L'absence de solution dans l'OPS signifie que tous les embryons sont sortis.

   Aucun contrôle microscopique n'est nécessaire.



Attention : *si la solution reste dans l'OPS, vous ne pouvez pas répéter le même processus !*

N'essayez pas de fermer puis ouvrir encore et encore. Insérez simplement la pointe de la micropipette dans l'extrémité ouverte de l'OPS et expulsez soigneusement le milieu dans la paillette chauffante. Vous pouvez également rincer l'extrémité de l'OPS avec un pipetage délicat à l'intérieur et à l'extérieur. Il s'agit d'une procédure d'urgence pour les débutants, très rarement nécessaire dans la pratique de routine.

Il est fortement recommandé de commencer par un peu de pratique, quelques séries de simulation de réchauffement-expulsion en utilisant des embryons dégénérés.

N'oubliez pas : *vous devez refroidir correctement l'OPS (10-15 min dans de l'azote liquide) afin d'expulser le contenu avec l'air chaud à l'intérieur.*

3.5 Transfert d'embryons

Le transfert peut être effectué immédiatement après le réchauffement ou < 15 min plus tard. Gardez les paillettes DT au chaud pendant la période d'attente en les plongeant à nouveau dans le bocal avec contenant de l'eau à 39°C.

Avant le transfert, coupez simplement l'extrémité de l'entonnoir de la paillette DT avec des ciseaux et insérez la paillette dans le cathéter de transfert d'embryon.

ADDENDUM

1 Défini ou non - le problème de la supplémentation en protéines

Depuis la première tentative de culture d'embryons de mammifères in vitro, l'un des principaux objectifs était de créer un milieu complètement défini, sans aucun composant inconnu, afin d'éliminer les incohérences et d'éviter toute contamination potentielle et de rendre le résultat plus prévisible

Des additifs définis, à savoir des macromolécules inorganiques, pourraient fournir un support physique approprié, c'est-à-dire une activité tensioactive pour empêcher l'adhésion ou optimiser la pression osmotique. Cependant, l'albumine purifiée transporte des vitamines, des hormones, des lipides bioactifs et des ligands ; elle neutralise également certaines toxines qui peuvent être présentes dans les milieux de culture embryonnaire. Ces effets augmentent les taux de développement tant in vitro qu'après le transfert des embryons. Une amélioration supplémentaire peut être obtenue par une supplémentation protéique plus complexe, par exemple, l'ajout de globulines ou l'utilisation de sérum à la place des protéines purifiées.

Cependant, le sérum dans un milieu de culture est considéré comme un péché capital de nos jours -bien que l'accusation ait un dossier boiteux.

L'argument est que le sérum - contrairement à l'albumine - n'est pas un composant du fluide oviductal ou utérin. Mais l'EDTA ou le PVA sont-ils des constituants naturels ?

L'autre préoccupation est que le sérum peut provoquer des anomalies de développement résumées par le "syndrome de la progéniture nombreuse". Une autre légende urbaine, tout comme l'histoire du "DMSO toxique" et la nécessité de rafraîchir le milieu de culture pendant la culture embryonnaire. A part les moutons, il n'y a pas de preuve que le sérum cause une progéniture nombreuse chez les autres mammifères (Jeremy Thompson, communication personnelle). D'autre part, les altérations morphologiques subcellulaires ne sont pas liées au sérum mais à son excès. Tout comme pour l'albumine (O'Neill, 2008), une fraction de la quantité traditionnelle de 20% de sérum est plus que suffisante pour fournir un excellent support et ne provoque aucun effet indésirable.

Nous vous conseillons fortement de ne pas jeter le bébé avec l'eau du bain. Utilisez des milieux avec un supplément de 5% de FCS comme dans le milieu de culture unique VitaVitro®.

Ou, avec un petit effort supplémentaire, préparez et ajoutez du sérum de vache adulte "fait maison" dans les milieux dépourvus de protéines. Les sérums prélevés sur des bovins adultes contiennent deux fois plus de protéines que leur homologue fœtal ou néonatal. Le sérum d'adulte peut doubler le taux de croissance des monocouches de fibroblastes (Vajta et al., 2003) et améliore substantiellement le développement des embryons bovins (Holm et al., 1999). L'effet ne dépend pas du cycle de reproduction ou de l'âge de l'animal donneur.

Il peut y avoir des variations d'un animal à l'autre, mais une fois que vous avez trouvé un donneur approprié, il peut être utilisé pendant toute une vie. D'après notre expérience, sur quatre vaches bien nourries et en bonne santé, au moins une fournit un excellent sérum pour la culture embryonnaire. Nous suggérons donc de prélever une petite quantité de sang sur quatre candidates, de tester les quatre sérums dans trois expériences consécutives de culture embryonnaire et d'utiliser le meilleur pendant des années. Le prélèvement sanguin sur les bovins (jusqu'à un litre par session) et la préparation du sérum est une tâche de routine pour les vétérinaires et les experts en culture tissulaire.

(Veuillez noter que la procédure d'inactivation par la chaleur, autrefois à la mode, n'est pas vraiment nécessaire et peut compromettre l'effet bénéfique en détruisant certains facteurs de croissance). Permettez-nous de fournir un argument supplémentaire, très subjectif. Au 21ème siècle, quand nous ne sommes pas occupés avec les problèmes du COVID et d'armées envahissantes, nous luttons contre tout ce qui est synthétique. Les gens préfèrent les médicaments naturels, les vêtements, et les engrais. Retour à la nature. Devrions-nous priver nos embryons de douzaines de produits naturels de soutien... composants connus et inconnus du sérum - juste parce que nous ne savons pas précisément ce qu'ils sont et comment ils fonctionnent ?

Voir les informations et les arguments supplémentaires dans : Vajta et al., 2008.

2 Azote liquide et sécurité au travail

Il s'agit d'une question sensible, c'est pourquoi nous cachons nos commentaires dans l'addendum. Cependant, nous devons garder à l'esprit que nous enfreignons les règles de sécurité au travail lorsque nous travaillons avec de l'azote liquide dans le laboratoire d'embryologie. Pas la paperasserie bureaucratique irrationnelle habituelle, mais une directive rationnelle qui peut nous protéger des accidents graves. Nous ne violons pas une seule règle. Nous les transgressons presque toutes.

Nos raisons sont simples. Le respect de toutes les réglementations en vigueur compromettrait sérieusement notre travail de cryoconservation. Aucune procédure de vitrification existante (ou un pipetage délicat) ne peut être effectuée efficacement en utilisant les gants épais requis. Nous avons besoin des yeux nus pour les microscopes et aurions besoin de lunettes de sécurité pour un refroidissement et un réchauffement rapides. Nous n'avons tout simplement pas le temps de nous changer entre ces phases de travail. Et ainsi de suite.

Nous n'avons aucune idée de la manière de résoudre ce conflit et nous sommes reconnaissants aux autorités qui, par inadvertance ou délibérément (dans un noble but), tolèrent notre comportement indiscipliné. Cependant, nous devons toujours être conscients que nous jouons avec quelque chose comme le feu. Aussi, nous devons suivre strictement les règles qui n'entravent pas notre travail, ne mettent pas en danger nos ovocytes et nos embryons et peuvent nous protéger des blessures et de la mort.

Sans plus d'arguments, copions-collons les phrases pertinentes du volume 1, car, selon notre expérience mondiale, ces suggestions ne peuvent pas être répétées assez souvent.

"Les pièces utilisées pour le stockage des dewars d'azote liquide (d'un volume total supérieur à 50 L, donc pratiquement dans tous les laboratoires d'embryologie humaine) doivent toujours être équipées d'une ventilation sûre et robuste, ainsi que d'un détecteur de la faible teneur en oxygène (avec des affichages à l'extérieur et à l'intérieur de la pièce de stockage) également muni d'un système d'alarme. En cas de faible taux d'oxygène (inférieur à 18%), un appareil respiratoire à adduction d'air est indispensable pour entrer dans la pièce, même pour secourir une personne en danger. Un ou deux ensembles de tels équipements de sauvetage placés à proximité de la porte d'entrée de la salle de stockage peuvent sauver des vies. L'absence de ces précautions a déjà provoqué un accident mortel dans un laboratoire européen d'embryologie des animaux domestiques. "

Il convient également de mentionner que l'azote liquide ne peut en aucun cas être transporté dans un véhicule fermé, c'est-à-dire que personne ne doit voyager dans la même cabine dans laquelle l'azote liquide est transporté.

3 Efficacité et stabilité

La production d'embryons en laboratoire est une procédure complexe constituée de plusieurs étapes, avec d'innombrables variables et de nombreux facteurs imprévisibles. Par conséquent, les résultats sont incertains.

Nous proposons deux stratégies pour atteindre un niveau acceptable de pronostic. Tout d'abord, subdiviser la procédure multi-étapes en petites parties tout en évaluant l'efficacité de chacune d'elles individuellement. En second lieu, la standardisation de tous les facteurs contributifs, y compris les constituants physiques, chimiques et biologiques, toutes les méthodes et, enfin et surtout, les compétences et l'expérience des praticiens.

Tous ces points semblent clairs et évidents, il est inutile de les énumérer. Nous sommes d'accord. Nous ne prétendons pas avoir découvert la clé de voûte de la philosophie. Pourtant, d'après notre expérience, l'application pratique de ces principes est rare et fortuite. Par conséquent, nous suggérons une petite auto-analyse, puis une remise en question systématique de la pratique de laboratoire - tant pour la recherche que pour le travail de routine - et de mettre en œuvre certains changements si nécessaire.

3.1 Points de contrôle

Heureusement, la plupart des procédures de production d'embryons se déroulent sous un stéréomicroscope ou un microscope inversé, offrant une possibilité d'évaluation morphologique. Nous suggérons d'utiliser cette opportunité systématiquement à chaque phase du travail. Bien que certains points aient déjà été mentionnés dans les paragraphes correspondants, nous les énumérons ici à nouveau et les complétons avec d'autres énumérons potentiellement utiles.

- Jour -1 : Collecte des ovocytes pour la maturation

  Minimum de 2-3 couches compactes de cellules du cumulus tout autour ; pas de variations morphologiques drastiques de la taille et du cytoplasme

- Jour 0 : Ovocytes après maturation

  Ovocytes assemblés en un seul grand groupe flottant dans la boite ; cumulus étendu de manière homogène ; pas de différences entre les complexes cumulus-ovocytes

- Jour 1, avant agitation au Vortex

  Apparition d'un aspect catastrophique ("Paysage après la bataille "), les complexes se détachent, se dispersent au fond de la boite ; des amas de cellules du cumulus attachés au fond ; quelques spermatozoïdes rampant désespérément.

- Jour 1, après agitation au Vortex

  Loin de l'image idyllique attendue : au lieu de la vue originale des ovocytes en Métaphase II (taille égale, remplissant environ 90% de l'espace dans la zone pellucide ; cytoplasme brun homogène), les zygotes présomptifs ont une taille réduite, remplissant 70-80% de l'espace ; cytoplasme sombre avec d'éventuelles zones claires ; une certaine dysmorphie, y compris une forme réniforme ; et en général, une sorte d'aspect perturbé. Ne vous inquiétez pas, ce sont de bons signes ; vos zygotes sont heureux et actifs.

- Jour 6, après-midi

  Environ 80-85% de clivage, 60-65% de morula compactes et de blastocystes précoces, dont 10-15% de blastocystes.

- Jour 7, matin

  Taux de blastocystes de 50 %, au moins la moitié d'entre eux sont des blastocystes développés, quelques-uns éclosent ou sont éclos.

- Jour 8, matin

  80 à 90 % des blastocystes devraient être éclos.

Une autre possibilité, très utile mais rarement utilisée, consiste à tester une voie alternative : l'activation parthénogénétique (AP). Avec les bons produits chimiques et en utilisant strictement le protocole correct, elle produit exactement les mêmes taux de blastocystes chez les bovins que la fécondation in vitro (FIV) avec la semence du taureau le plus performant.

L'intérêt de cette approche est de pouvoir déterminer la raison d'un taux de blastocystes insuffisant en une seule expérience.

Taux/qualité des blastocystes au 7ème jour				
AP	Mauvaise	Bonne	Mauvaise	Bonne
FIV	Mauvaise	Mauvaise	Bonne	Bonne
Problème	(Ovocytes ou) Culture	Sperme ou Fécondation	La méthode PA	Pas de problème !

Si l'expansion du cumulus était parfaite, les doubles mauvais résultats indiquent presque toujours des problèmes de culture embryonnaire. Une bonne AP et une mauvaise FIV signifient un problème de sperme ou de fécondation ; les deux sont faciles à identifier et à corriger. Si la méthode PA seule est inefficace, nous vous suggérons de la corriger pour les tests futurs. Et si tout est bon, alors détendez-vous, le problème s'est résolu de lui-même (avec un peu de chance).

Les principaux signes morphologiques d'une procédure réussie ont été décrits pour la vitrification dans le chapitre précédent. Il convient de souligner à nouveau que, contrairement à ce qui se passe chez l'homme, le collapsus total des blastocystes bovins dans les 3 à 4 minutes qui suivent le réchauffement fait partie de la stratégie de survie réussie ; il peut aider à éliminer rapidement les cryoprotecteurs des blastocystes.

En suivant ces points de contrôle, il est possible d'établir/améliorer le système de production d'embryons et de résoudre les problèmes si l'efficacité globale est compromise. Veuillez noter que, comme dans la plupart des processus biologiques (ou cuisiner), on ne peut espérer de bons résultats que si toutes les étapes précédentes ont été menées à bien. Les efforts tardifs de Les efforts tardifs peuvent contribuer à réduire les dommages, mais n'aboutiront pas à des résultats impeccables.

3.2 Régularité

"Si un système embryonnaire fonctionne, NE CHANGEZ RIEN, pas même votre caleçon" (Paul J. Booth, communication personnelle)

Assurez-vous d'avoir une grande réserve de tout. Achetez des articles auprès des entreprises fiables, et achetez de grandes quantités du même lot - la quantité maximale doit être utilisée dans les délais de la date d'expiration.

Enregistrez chaque changement dans l'approvisionnement, chaque événement qui peut avoir le moindre effet sur les embryons. Il ne s'agit pas seulement des rapports obligatoires d'accidents qui peuvent se produire, mais aussi des notes subjectives et officieuses sur une odeur étrange ou une teinte temporaire d'un milieu. Ces notes peuvent devenir précieuses dans le cadre d'un dépannage rétrospectif - une activité cauchemardesque mais fréquente dans les laboratoires d'embryologie.

Essayez de tout réaliser, chaque petit détail, exactement comme dans le protocole précédent réussi de PIV- vitrification. Essayez-le, bien que cela ne se produise jamais ainsi. Il est impossible de répéter le travail d'embryologie exactement de la même manière. Les personnes qui insistent sur le fait qu'elles peuvent le faire sont superficielles et ne tiennent pas compte de quelque chose qui peut être important. Les vrais scientifiques, au contraire, ne cachent pas leurs erreurs – pas même inconsciemment - mais les cherchent, les répertorient et ne les oublient jamais.

Nous avons entendu de nombreuses histoires sur la façon dont les grandes découvertes sont nées d'expériences ratées. Bien que beaucoup de ces anecdotes soient des légendes urbaines colorées, certaines pourraient être vraies. En outre, tôt ou tard, si vous faites (et documentez) suffisamment d'erreurs, de telles choses vous arriveront aussi. Qu'il s'agisse de confesser la véritable histoire ou d'emballer la partie désordonnée dans le papier cadeau d'une brillante théorie scientifique (une hypothèse que vous avez établie rétrospectivement) votre erreur peut être à l'origine du meilleur article de votre carrière marquer un progrès majeur dans la discipline concernée.

Mais tout cela ne peut se produire que si le reste de votre essai est exécuté de manière irréprochable.

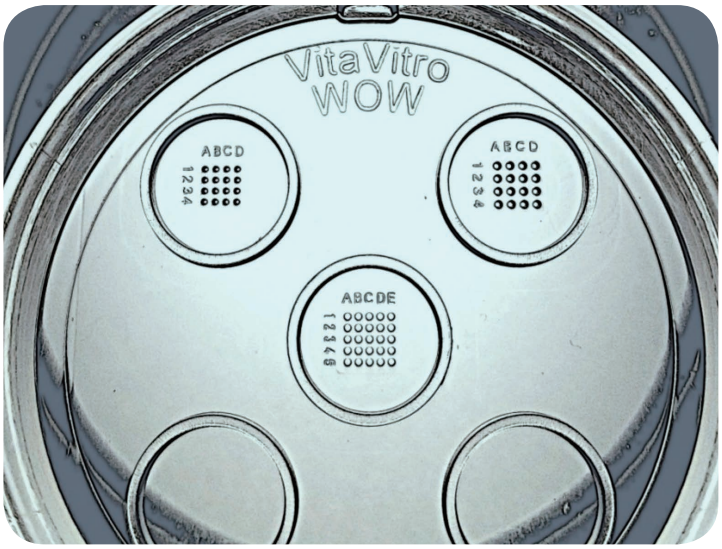
4 Techniques spéciales pour les situations particulières

4.1 The Well of the Well (WOW) dish of VitaVitro - group vs. individual culture

(Voir aussi la vidéo : https://vimeo.com/632766530?from=outro-local)

La culture de groupe des embryons au stade préimplantatoire de nombreuses espèces de mammifères, y compris les bovins, améliore considérablement le développement in vitro. En revanche, un faible nombre d'ovocytes/zygotes après l'OPU chez les bovins (ou la stimulation dans la reproduction assistée humaine) peut compromettre le développement.

La culture en micropuits offre une solution à ce problème. Les facteurs sécrétés par l'embryon ne sont pas dilués mais accumulés autour de la surface de l'embryon et soutiennent son développement : les facteurs paracrines sont remplacés par des facteurs autocrines. Les micropuits permettent également à l'embryon de créer et de maintenir son microenvironnement physique et chimique optimal, similaire à l'espace virtuel de l'oviducte.



Cependant, la plupart des micropuits disponibles ne conviennent pas à ces fins car ils ont été produits pour des études timelapse : leur taille est trop grande, et ils ont un fond plat pour la clarté optique.

La boîte WOW de VitaVitro® offre une solution pour les deux, avec des micropuits de tailles et de formes différentes, pour l'étude time-lapse et pour la culture individuelle optimale des embryons.

Dans ce dernier cas, il s'agit d'un puits conique à fond rond, les embryons sont cultivés dans un volume de 0,02 µl. De plus, environ 50 % de la surface de l'embryon est proche de la paroi du puits, permettant l'accumulation des ligands lourds sécrétés, tandis que les produits légers du métabolisme, y compris l'ammoniac, peuvent se déplacer et se diluer dans le volume de 50 µl de la goutte.

Grâce à ce système, la qualité et la compétence de développement des embryons cultivés individuellement sont les mêmes que ceux des grands groupes. Le système permet également l'identification et le suivi pendant toute la période de culture. Aucun changement de milieu ni aucune autre intervention n'est nécessaire pendant toute la période de culture.

Les boîtes doivent être préparéés la veille de la procédure. Réchauffez les deux boîtes, le milieu et l'huile à 39°C. Ajoutez 50 µl de milieu de culture individuelle VitaVitro® à chaque cercle, y compris ceux sans WOW. Couvrez-les avec 3 ml d'huile lourde VitaVitro®. Contrôlez les micropuits sous un stéréomicroscope. Des bulles peuvent être présentes dans quelques-uns (env. 10%), mais elles peuvent être éliminées facilement avec un microcapillaire. Incuber la boite pendant une nuit à 39°C dans un mélange gazeux 5 + 5 + 90 et une humidité maximale

Les embryons doivent être lavés rapidement dans les gouttes vides, puis transférés à proximité des WOW. Avec un pipetage léger ou en les bousculant délicatement ; chaque embryon doit être placé dans un puits individuel. Il faut faire bien attention à ne pas provoquer de chocs mécaniques sur la boite pendant le transport vers l'incubateur. De même, la porte de l'incubateur doit être fermée avec précaution pendant toute la durée de la culture. Les conditions de culture doivent être les mêmes que celles décrites ci-dessus.

Lors du retrait des embryons au 7ème jour, nous suggérons un rinçage soigneux plutôt qu'une aspiration. En raison de la forme conique, les blastocystes en expansion peuvent flotter spontanément hors des puits, à partir de l'après-midi du 7ème jour.

Voir plus de détails dans : Vajta et al. 2000 ; Madani et al. 2022.

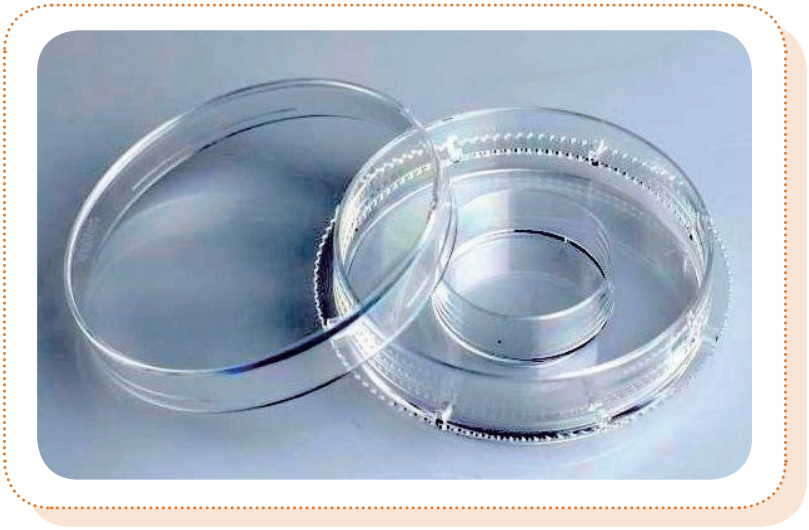
4.2 Le Humdish de VitaVitro® - description et mode d'emploi

(Voir aussi la vidéo : https://vimeo.com/manage/videos/773675929)

Le Humdish VitaVitro® est une boite en plastique stérile conçu pour la culture d'embryons préimplantatoires de mammifères, en particulier pour - mais pas seulement - les incubateurs secs ou ceux dont le taux d'humidité est irrégulier et non contrôlé.

Les paramètres uniques du Humdish VitaVitro® garantissent une humidité de >95-98% entre le Jour 0 (ou le Jour 1) et le Jour 7

(Jour 0 : jour de la fécondation ou de l'ICSI) dans des incubateurs secs ou (nominalement ou réellement) humides.



Le fait que la boite elle-même fournisse l'humidité assure la plus grande cohérence, en empêchant toute augmentation de l'osmolalité pendant toute la période de culture.

En effet, la grande quantité d'eau stockée dans l'anneau extérieur empêche les fluctuations de température lors de l'ouverture de la porte de l'incubateur ou un éventuel retrait temporaire (mais non suggéré) de la boite pour le contrôle visuel des embryons.

En fonction de cela, l'Humdish VitaVitro® offre des conditions optimales pour une culture ininterrompue dans un milieu unique pour le développement des embryons jusqu'au stade de blastocyste.

L'Humdish VitaVitro® peut être utilisé dans n'importe quel incubateur disponible dans le commerce qui peut accueillir des boites standard de 60 mm de diamètre, y compris les incubateurs secs ou "humides" à chargement par le haut, les incubateurs de type boîte ou diverses nouvelles combinaisons de ces différents modèles.

Instructions d'utilisation

Suggestion : réchauffez le Humdish à 37-38°C, et utilisez de l'huile et de l'eau à température ambiante. Préparez la boîte de culture sur une plaque chaude à 37°C pour éviter toute condensation ultérieure de la vapeur sur le couvercle.

1. Selon le besoin réel, faites plusieurs gouttes dans le compartiment intérieur du Humdish.

   Nous suggérons tout volume compris entre 5 et 20 µl. Recouvrez les gouttes de 3 mL d'huile minérale.

   Pour éviter une éventuelle augmentation de l'osmolalité pendant la préparation des gouttes, vous pouvez envisager d'utiliser la méthode drop-in : immédiatement après avoir recouvert les gouttes d'huile, retirez 80-90% des gouttes et remplacez-les avec un nouveau milieu. Utilisez de l'huile à température ambiante.

2. Ajouter de l'eau

   Ajoutez 12 mL d'eau stérile ultra-pure dans l'anneau extérieur. Éviter les éclaboussures d'eau dans l'anneau intérieur.

3. Équilibration

   Transférer le Humdish VitaVitro® dans un incubateur avec une atmosphère de 37°C[5] de température, 5, 5% de CO_2, 5% d'O_2, et 90% de N_2, et (de préférence, pour éviter toute évaporation avant utilisation) une humidité maximale. Incuber toute la nuit.

4. Transférer les embryons dans le Humdish VitaVitro®.

   Après les avoir lavés deux fois dans une goutte de culture, transférer les embryons dans une nouvelle goutte et les incuber jusqu'au stade requis. Le Humdish offre des conditions optimales pour la culture en milieu unique sans interruption jusqu'au stade du blastocyste.

Supplément optionnel - Couvercle avec un capteur d'humidité intégré

Avertissement : le couvercle fourni avec un capteur N'EST PAS DESTINE A SURVEILLER les boites contenant des embryons !

Le but de cet outil supplémentaire est de tester et de prouver l'efficacité du Humdish VitaVitro® pour établir et maintenir un niveau d'humidité élevé pendant toute la période de culture dans votre incubateur.

Si vous avez des doutes sur la nécessité et l'efficacité du Humdish VitaVitro® dans vos incubateurs, nous vous suggérons de faire deux mesures simples avec les boites

- avec la zone centrale remplie de gouttes et d'huile, comme décrit ci-dessus, et
- avec ou sans eau dans l'anneau extérieur, respectivement.

Placez le dispositif de contrôle câblé à l'extérieur de l'incubateur et surveillez les paramètres pendant toute la période (5, 6 ou 7 jours) de la culture embryonnaire de routine.

Si vous ne constatez aucune différence dans les valeurs d'humidité entre les deux mesures, le Humdish VitaVitro® ne sera nécessaire dans votre laboratoire.

Voir plus de détails dans : Chen et al., 2021.

REFERENCES:

Chen WB, Machaty Z, Marconetto A, Parmegiani L, Vajta G.

A Simple and Efficient Solution to Eliminate Evaporation in Mammalian Embryo Cultures.

Cell Reprogram. 2021 Oct;23(5):316-318. doi: 10.1089/cell.2021.0061.

Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ.

Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods.

Animal. 2020 May;14(5):991-1004. doi: 10.1017/S1751731119002775.

Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H.

High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins.

Theriogenology. 1999 Sep;52(4):683-700. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00162-4.

O'Neill C.

Review: The potential roles for embryotrophic ligands in preimplantation embryo development.

Hum Reprod Update. 2008 May-Jun;14(3):275-88. doi: 10.1093/humupd/dmn002.

Pieterse MC, Vos PL, Kruip TA, Wurth YA, van Beneden TH, Willemse AH, Taverne MA.

Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes.

Theriogenology. 1991 Apr;35(4):857-62. doi: 10.1016/0093-691x(91)90426-e.

Madani S, Machaty Z, Vajta G.

An Alternative Way to Improve Mammalian Embryo Development In Vitro: Culture of Zona Pellucida-Free Embryos.

Cell Reprogram. 2022 Jun;24(3):111-117. doi: 10.1089/cell.2022.0012.

Martino A, Pollard JW, Leibo SP.

Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence.

Mol Reprod Dev. 1996 Dec;45(4):503-12. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199612)45:4<503::AID-MRD13>3.0.CO;2-X.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H.

Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos.

Mol Reprod Dev. 1998 Sep;51(1):53-8. doi: 10.1002/(SICI)1098

2795(199809)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V.

Vajta G, Murphy CN, Macháty Z, Prather RS, Greve T, Callesen H.

In-straw dilution of bovine blastocysts after vitrification with the open-pulled straw method.

Vet Rec. 1999 Feb 13;144(7):180-1. doi: 10.1136/vr.144.7.180.

Vajta G, Peura TT, Holm P, Páldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H.

New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system.

Mol Reprod Dev. 2000 Mar;55(3):256-64. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<256::AID-MRD3>3.0.CO;2-7.

Vajta G, Lewis IM, Trounson AO, Purup S, Maddox-Hyttel P, Schmidt M, Pedersen HG, Greve T, Callesen H.

Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro.

Biol Reprod. 2003 Feb;68(2):571-8. doi: 10.1095/biolreprod.102.008771.

Vajta G, Rienzi L, Cobo A, Yovich J.

Embryo culture: can we perform better than nature?

Reprod Biomed Online. 2010 Apr;20(4):453-69. doi: 10.1016/j.rbmo.2009.12.018.

Vajta G, Parmegiani L, Machaty Z, Chen WB, Yakovenko S.

Back to the future: optimised microwell culture of individual human preimplantation stage embryos.

J Assist Reprod Genet. 2021 Oct;38(10):2563-2574. doi: 10.1007/s10815-021-02167-4.

REMERCIEMENTS ET COMMENTAIRES FINAUX

Les auteurs tiennent à remercier tous ceux qui ont soutenu ce travail par des photos, des données, des suggestions, critiques, ou simplement de la tolérance. Nous nous excusons auprès de nos familles pour le temps que nous avons volé à d'autres activités, potentiellement plus productives et utiles.

Tout comme pour le volume 1, nous devons remercier tout particulièrement pour l'inspiration, le soutien continu et les encouragements à Mme Jenny Lin, PDG de VitaVitro BioTech Co., Ltd. (Shenzhen, Chine), et à toute l'entreprise.

Certaines des innovations présentées et toutes les réalisations commerciales ont été le fruit de notre collaboration unique au cours des huit dernières années. Nous sommes très reconnaissants à tous les membres du laboratoire d'embryologie de l'Institut danois des sciences agricoles (Foulum, Jylland, Danemark) pour les réalisations exceptionnelles qui ont permis d'établir de nombreuses techniques décrites dans ce chapitre.

Nous remercions la conceptrice créative et très douée, Mme Nara Yu, pour l'excellente mise en page. Nous devons également remercier tout particulièrement le Dr Giselle Gamarra et Eing. Serge Lacaze, Auriva Biotechnologies, Denguin, France ; le Dr Morné de la Rey et le Dr Robert Treadwell, Embryo Plus, Brits, Afrique du Sud, pour les photos relatives au travail sur les animaux.

Enfin, nous vous remercions d'avoir atteint la fin de ce chapitre. Nous espérons qu'il vous sera utile pour vos futurs travaux de recherche ou pour vos activités commerciales.

Le volume 2 se poursuivra avec d'autres chapitres traitant des techniques de reproduction humaine, du transfert nucléaire de cellules somatiques animales et d'autres questions. Des versions en différentes langues, dont l'anglais, le chinois, l'espagnol, le portugais, etc., seront également disponibles.

Nous espérons que notre communication sera bidirectionnelle. Les suggestions, commentaires et corrections sont les bienvenus. Pour cette version Française, veuillez prendre contact avec Sarah Madani via sarah.madani2020@gmail.com. Les lettres seront éditées et ajoutées à la page web.

Si nécessaire, nous apporterons également des modifications pertinentes au texte principal.

Les articles énumérés ci-dessous peuvent être commandés chez

VitaVitro Biotech Co. Ltd., Shenzhen, China,

Tel: +86 755 84 51 18 13

Email: tech@vitavitro.com

Webpage: www.vitavitro.com

VitaVitro

Pour plus de détails, un soutien technique, des collaborations potentielles et des ateliers pratiques sur place, veuillez contacter Gábor Vajta, RVT Australie, Cairns, Australie.

Email: gabor.vajta@hotmail.com

Webpage: https://gaborvajta.wixsite.com/rvt-australia

LISTE DES PRODUITS

Ordering infomation

Product Name	Specifications	Catalog No.	Shelf Life	Species
Vitrification Kit	CHM: 2 x 4.8 mL; CV1: 1 x 4.8 mL; CV2: 1 x 4.8 mL	DA01001	6 mois	
Warming Kit	CW1: 2 x 4.8 mL; CW2: 1 x 4.8 mL; CHM: 1 x 4.8 mL	DA02001	6 mois	
Direct Transfer Medium	4 x 4.8 mL	DA13001	6 mois	
OPS and related devices	OPS + Container straw (1+1) OPS + Container straw +DT straw(1+1+1) OPS (5) OPS (10) DT straws (5) DT straws (10) Storage tube for OPS	DA08001 DA08002 DA08003 DA08004 DA08005 DA08006 DA08007	2 ans	
Aspiration Medium	125 mL 250 mL 500 mL	DA04001 DA04002 DA04003	6 mois	
TCM-HEPES with 2% serum	60 mL	DA05001	3 mois	
Transfer Medium (with 20% serum)	4 x 4.8 mL	DA14001	3 mois	
IVM-Bicarbonate Medium	4 x 4.8 mL	DA07001	3 mois	
IVM-HEPES Medium	4 x 4.8 mL	DA07002	3 mois	
Sperm Preparation Medium	30 mL	DA10001	6 mois	
Sperm Gradient Kit	Sperm Gradient (55%) 30 mL Sperm Gradient (90%) 30 mL	DA10002	6 mois	
IVF Medium	30 mL	DA06001	3 mois	
IVC Single Medium	4 x 4.8 mL	DA03001	3 mois	
Heavy Paraffin Oil	60 mL	DA09001	2 ans	
Humdish	10 pièces/ Sac	DA11010	3 ans	
WOW dish	10 pièces/ Sac	DA12010	3 ans	
Cooling Box	1 pièce	VOPS04	N/A	