

Cryopréservation - Spermatozoïdes de souris

Procédure normalisée de fonctionnement 307 (PNF-307)

Date d'entrée en vigueur :
2 septembre 2026

Révision :

CBSA-26-172-08.3

Matériel

Appareils/Instruments / Équipements

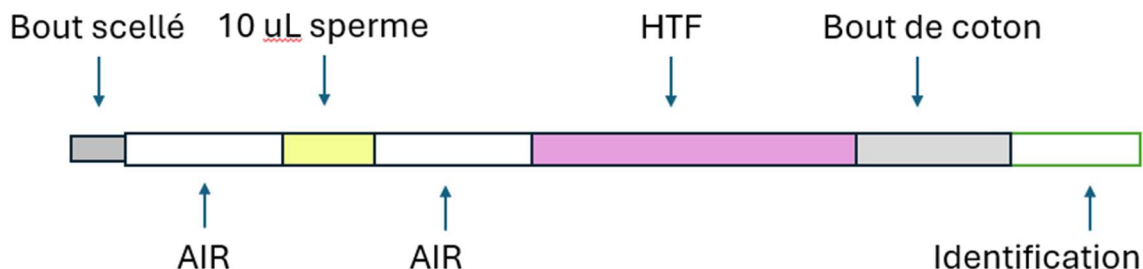
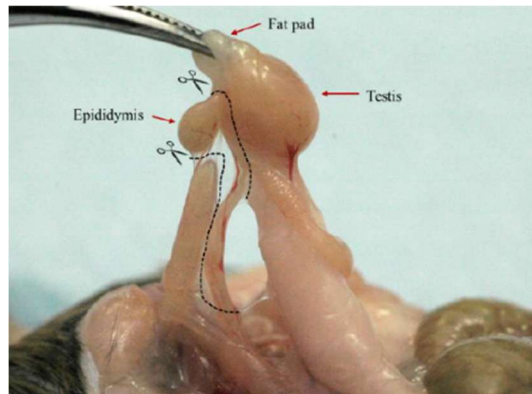
- Cryoprotecteur de spermatozoïdes (CPA)
- Aiguille 30G
- Huile minérale pour manipulation des embryons
- Milieu HTF + BSA
- Ciseau iris
- Pince à tissu sans dents
- Azote liquide
- P-touch et étiquettes
- Pipettes P1000, P100, + embouts
- Scelleuse à impulsion
- Pétri 35 mm
- Adaptateur paille-seringue (1 mL)
- Pailles pour cryopréservation de sperme
- Incubateur
- Filtre 0,22 µm
- Contenant pour azote liquide avec styromousse

Document et formulaire

- PNF-212 Euthanasie des rongeurs
- PNF-306 Préparation de solutions – Cryopréservation de spermatozoïdes et fécondation in vitro
- Logiciel SoftMouse

Procédures

1. Pour chaque mâle, préparer un pétri de 35 mm : déposer une goutte de 67.5 μL de CPA au centre et couvrir d'huile.
2. Ajouter une seconde goutte de CPA afin de former une goutte de 135 μL . Déposer le pétri dans l'incubateur à 37 °C. Laisser équilibrer pour un minimum de 20 minutes.
3. Ajouter 40 mg de BSA dans un tube de 10 mL de HTF et filtrer la solution avec un filtre 0,22 μm .
4. Marquer les pailles avec un marqueur permanent à 25, 45 et 95 mm. Dix pailles sont nécessaires pour chaque mâle.
5. Pousser le coton jusqu'à la marque de 95 mm.
6. Identifier les pailles avec des étiquettes P-Touch : nom du chercheur / lignée / génotype / date de la cryopréservation.
7. Attacher une paille à une seringue 1 mL
8. Aspirer du HTF/BSA jusqu'à la marque de 45 mm, puis de l'air jusqu'à la marque de 25 mm. Répéter pour chaque paille.
9. Euthanasier deux mâles par dislocation cervicale sous anesthésie à l'Isoflurane. Vaporiser l'abdomen avec de l'alcool 70 %.
10. Inciser la paroi abdominale et repérer les épидидymes caudaux.
11. Récolter les épидидymes et les déposer directement dans la goutte de 135 μL de CPA pré-équilibré à 37 °C.
12. Avec une aiguille 30G, strier les épидидymes afin de libérer les spermatozoïdes. Remettre le pétri dans l'incubateur pendant 1 minute 30.
13. Avec une petite pince, expulser le reste des spermatozoïdes, brasser légèrement le pétri et remettre dans l'incubateur pendant trois minutes.
14. À l'aide d'une pipette P100, faire dix gouttes de 10 μL dans le couvercle du pétri.
15. Aspirer une goutte par paille et de l'air jusqu'à ce que le HTF touche au coton. Attention, cette étape doit être faite très rapidement pour que les gouttes ne sèchent pas.
16. Sceller le bout de la paille avec la scelleuse à impulsion.



17. Déposer les pailles scellées sur la styromousse dans le récipient d'azote liquide.



18. Fermer le couvercle du récipient et laisser agir les vapeurs d'azote pendant dix minutes.
19. Plonger ensuite les pailles directement dans l'azote liquide du récipient.
20. Récupérer les pailles avec une pince et les entreposer dans une boîte pour réservoir d'azote liquide.
21. S'assurer de bien noter dans le logiciel SoftMouse l'emplacement des pailles dans les contenants d'azote (Dewar).

*****Par mesure de sécurité, entreposer la moitié des pailles dans un réservoir et l'autre moitié dans un autre réservoir.**

Références

<https://media.jax.org/m/063a83c79fe3ffe4/original/sperm-cryo-protocol.pdf>

<https://www.infrafrontier.eu/emma/cryopreservation-protocols/>

Révisée par :

Adjointe au doyen, responsable de l'animalerie :
--

Fanny Longpré

Technicienne en santé animale :

Nadia Desnoyers

Vétérinaire :

Dorine Gilbert, DMV
