

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 529 441

②1 N° d'enregistrement national :

82 11603

⑤1 Int Cl³ : A 01 N 1/02; A 61 J 1/00; G 09 F 3/00.

⑫

DEMANDE DE CERTIFICAT D'ADDITION À UN BREVET D'INVENTION

A2

②2 Date de dépôt : 1^{er} juillet 1982.

③0 Priorité

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 1 du 6 janvier 1984.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés : 1^{re} addition au brevet 82 00645 pris le 15 jan-
vier 1982.

⑦1 Demandeur(s) : *INSTITUT NATIONAL DE LA RE-
CHERCHE AGRONOMIQUE.* — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Jean-Paul Renard, Jean-Pierre Ozil et
Yvan Heyman.

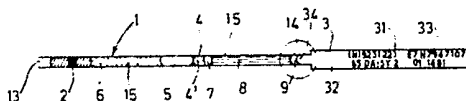
⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Harlé et Phélip.

⑤4 Paillette munie d'un jonc d'identification pour la conservation par congélation d'embryons de mammifères.

⑤7 La paillette 1 comporte un deuxième bouchon extrême de scellement 3 qui est un jonc 31 en matière synthétique dont le corps 32 est plus large que celui de ladite paillette 1 et dont l'extrémité 34 dudit jonc 31 provoquant l'éclatement de la bulle 7 qui lors de la décongélation s'élève le long de la fraction du milieu assurant la dilution du cryoprotecteur, et emmanchée à force par au moins un méplat dans l'une des extrémités 14 de la paillette 1 après son remplissage à raison d'une longueur qui est choisie à volonté pour calibrer avec précision ladite bulle 7.

Application à l'identification d'embryons congelés.



La présente addition concerne une paillette pour la conservation par congélation d'embryons de mammifères selon le brevet principal 82.00.645; elle a trait plus particulièrement à un perfectionnement d'un des bouchons destiné à l'obturation de ladite paillette.

En premier lieu, il existe à l'heure actuelle un besoin d'identification d'un embryon congelé dans une paillette telle que celle décrite dans le brevet principal 82.00.645.

On sait en effet que de telles paillettes avant utilisation sont conservées dans de l'azote liquide. Elles portent généralement sur leur corps diverses informations nécessaires à l'identification comme les références de l'organisme ayant congelé les embryons, la date de congélation, la race et les références de la donneuse.

Etant donné que ces indications sont portées directement sur le corps de la paillette, un opérateur doit pour l'identification sortir pendant quelques instants la paillette de l'azote liquide afin de lire lesdites indications.

L'embryon qui est généralement congelé dans un volume de 10 à 40 μ l se réchauffe très rapidement dès qu'on le sort de l'azote liquide. Il est bien connu que la vitesse de réchauffement entre - 196°C et - 60°C est sensiblement de l'ordre de 360°C/min.

La lecture effectuée directement sur la paillette est donc une source de réchauffement non contrôlée qui favorise la recristallisation du milieu congelé.

Une telle recristallisation est d'autant plus marquée quand les cellules contiennent une certaine quantité de glace intracellulaire (FARRANT, HEATHER and WALTER, 1977 - Effects of interactions between cooling and rewarming conditions on survival of cells. In : "The freezing of Mammalian embryos, Ciba Foundation Symposium, 52, Elsevier, Excerpta Medica, North Holland). Or, c'est précisément le cas avec le type de congélation actuellement utilisé pour les embryons.

Il existe donc un problème concernant l'identification de telles paillettes.

Il existe en outre un problème concernant le calibrage de la bulle de gaz qui est située entre la fonction
5 contenant le cryoprotecteur et par conséquent l'embryon et la fraction qui, après décongélation, assure la dilution du cryoprotecteur.

La présente invention apporte une solution à ces problèmes en proposant une paillette pourvue d'un bouchon assurant tant une identification précise de l'embryon placé
10 dans ladite paillette qu'une possibilité de calibrage de la bulle de gaz sus-mentionnée, tout en permettant un montage plus aisé de la paillette.

Selon la présente invention, il est prévu une paillette pour la conservation par congélation d'embryons
15 de mammifères dans un milieu de conservation capable d'être congelé et décongelé et comprenant une substance cryoprotectrice (ou cryoprotecteur) qui pénètre à l'intérieur des cellules de l'embryon, ladite paillette étant scellée à ses deux
20 extrémités jusqu'au moment de l'utilisation dans le mammifère, l'embryon dans le milieu de conservation par congélation étant entouré respectivement : (A) d'une part successivement en direction d'une extrémité (a) d'un mélange gazeux, (b) d'un milieu de culture et (c) d'un premier bouchon extrême
25 de scellement, et

(B) d'autre part successivement en direction de l'autre extrémité, (d) d'une bulle de gaz, (e) d'une solution d'au moins une substance miscible à l'eau, peu ou pas toxique à la température ambiante vis-à-vis de l'embryon qui ne pénètre pas à l'intérieur
30 des cellules de l'embryon et qui assure à l'extérieur de celui-ci une pression osmotique suffisante pour permettre une diffusion progressive du cryoprotecteur à l'extérieur des cellules, la disposition étant telle que, à la décongélation, l'embryon dans son milieu de conservation est mis directement en contact avec la solution, (f) d'une autre bulle
35 de gaz et (g) d'un deuxième bouchon extrême de scellement,

paillette dans laquelle le deuxième bouchon extrême de scellement est un jonc en matière synthétique dont le corps est plus large que celui de ladite paillette et dont l'extrémité dudit jonc, provoquant l'éclatement de la bulle qui, lors de la décongélation, s'élève le long de la fraction du milieu assurant la dilution du cryoprotecteur, est emmanchée à force par au moins un méplat dans l'une des extrémités de la paillette après son remplissage à raison d'une longueur qui est choisie à volonté pour calibrer avec précision la dite bulle.

La présente invention concerne également les caractéristiques ci-après considérées isolément ou selon toutes leurs combinaisons techniquement possibles :

- l'extrémité du jonc assurant l'éclatement de la bulle présente une forme de calotte sphérique,
- l'extrémité du jonc assurant l'éclatement de la bulle présente une forme de tronc de cône;
- l'extrémité du jonc assurant l'éclatement de la bulle présente une forme de cône;
- la forme en tronc de cône ou de calotte sphérique de l'extrémité du jonc est surmontée d'une courte pointe;
- le corps du jonc comporte des symboles nécessaires à l'identification de la paillette;
- le jonc est en matière plastique injectée;
- le jonc est en polychlorure de vinyle;
- l'emmanchement à force du jonc est renforcé en soumettant la zone de jonction à une opération de soudage.

L'invention est illustrée en référence aux dessins annexés sur lesquels :

Fig. 1 illustre la structure d'une paillette selon la présente invention avant la congélation.

Fig. 2 est un détail de l'extrémité d'un jonc en forme de calotte sphérique.

Fig. 3 est un détail de l'extrémité d'un jonc en forme de tronc de cône.

Fig. 4 est un détail de l'extrémité d'un jonc en forme de cône.

5 Aux dessins annexés, la paillette est désignée dans son ensemble par 1 et ses parois par 15. Elle est obturée à une de ses extrémités 13 par un bouchon 2, qui est par exemple un bouchon d'alcool polyvinylique. L'embryon 4' se trouve dans un cryoprotecteur 4 et est entouré respectivement par un mélange gazeux 5 et une bulle de gaz 7. Entre le mélange gazeux 5 et le bouchon 2 se trouve le milieu de culture 6. Une solution 8 d'au moins une substance miscible à l'eau, peu ou pas toxique à la température ambiante, vis-à-vis de l'embryon, qui ne pénètre pas à l'intérieur des cellules de l'embryon 4' mais qui assure à l'extérieur de l'embryon une pression osmotique suffisante pour 10 permettre une diffusion progressive du cryoprotecteur 4 à l'extérieur des cellules, est prévue entre la bulle de gaz 7 et une autre bulle de gaz 9 qui sépare ladite solution 8 du bouchon 3. 15

20 Le bouchon 3 qui est prévu à l'extrémité 14 de la paillette 1 est un jonc 31, en matière plastique dont le corps 32 est plus large que celui de la paillette 1. Ce jonc 31 est serti ou emmanché à force à une de ses extrémités 34 pourvue au moins d'un méplat dans l'extrémité 14 de la paillette 1. L'extrémité 34 du jonc 31 en forme de calotte 25 sphérique 34a, de tronc de cône 34b ou de cône 34c muni ou non d'une fine pointe 34d facilite après la décongélation l'éclatement de la bulle 7 lorsqu'elle arrive au contact du jonc 31, ce qui évite lors du retournement de la paillette 1 un mouvement de retour de la bulle 7 à l'intérieur de la 30 paillette 1. Un tel mouvement peut perturber le déplacement de l'embryon 4' le long de la colonne constituée par le mélange des fractions 4 et 8. Le jonc 31 est emmanché après le remplissage de la paillette 1 à raison d'une longueur qui est choisie à volonté pour calibrer avec précision la 35 bulle 7. Grâce à un effet de piston dû à l'emmanchement réglable du jonc 31, la bulle 7 peut être calibrée avec une

très grande précision. Le jonc 31 comporte des symboles nécessaires à l'identification de la paillette 1; il est donc possible, selon la présente invention, tout en maintenant la possibilité de porter une identification directement sur la paillette 1, d'inscrire les symboles sur le jonc de matière plastique 31 qui possède une certaine inertie thermique et qui est serti dans l'extrémité 14 de la paillette 1. Pour la lecture, seule la sortie du jonc de matière plastique 31 hors de l'azote liquide est nécessaire, la paillette proprement dite 1 étant laissée dans l'azote liquide. Le recours à un code de couleurs corps 32 du jonc 31 - extrémité 14 permet une première identification pour des lots de paillettes stockées dans le récipient d'azote liquide. Pour que la longueur paillette 1 - jonc 31 reste compatible avec les possibilités de stockage dans les différents récipients disponibles actuellement sur le marché, la longueur totale de la paillette 1 est réduite comme indiqué ci-après .

Comme on l'a mentionné ci-dessus, la jonc-bouchon 3, 31 permet également un montage plus aisé de la paillette. En effet pour pouvoir monter dans la paillette 1 à la décongélation, la bulle 7 doit être de volume réduit : 20 μ l pour les paillettes de 500 μ l, 6-8 μ l pour les paillettes de 250 μ l. Le calibrage de la bulle 7 doit être effectué avec précision lors du montage de la paillette 1. Si l'on prélève un volume d'air légèrement inférieur, le risque de mélange des deux fractions existe et il faut recommencer l'opération. Le jonc de matière plastique 31 au cours de l'emboîtement à l'extrémité 14 de la paillette 1 comprime les fractions gazeuses au montage et leur volume diminue. Cette diminution de volume liée à la longueur du jonc 31 inséré dans la paillette 1 rend plus aisé le montage : l'opérateur peut prélever un volume plus important et contrôler à la fin des opérations le volume des fractions d'air ou mélange gazeux, en jouant sur la longueur du jonc 31 inséré dans la paillette 1.

L'emmanchement à force ou sertissage du jonc en matière plastique 31 dans la paillette 1 peut être éven-

tuellement renforcé en soumettant la zone de jonction aux effets d'un soudage. Un tel procédé, par exemple, à l'aide d'une courte impulsion de soudage permet de parfaire la soudure des deux éléments en matière plastique afin de garantir l'inviolabilité de la paillette 1.

Selon la présente invention, on a réalisé des paillettes de diamètre interne de 2,8 mm (correspondant à celui des paillettes de 500 μ l) et des paillettes de diamètre interne de 1,7 mm (correspondant à celui de paillettes de 250 μ l).

On indique ci-après le rapport en volume et en longueur des éléments constitutifs pour une paillette de petit diamètre, savoir 250 μ l.

Fraction	Longueur en mm	Volume approximatif en μ l
Embryon (4-4')	5	12
Mélange gazeux (5)	10	24
Bulle de gaz (7) entre l'embryon (4-4') et la solution (8)	2,5	6
Solution sucrose (8)	25	55
Milieu de culture (6)	25	55
Bulle d'air terminale (9)	2,5	6
Total paillette (1) sans bouchon (2)	70	<u>2</u> 160
Longueur totale paillette (1) sans jonc (31)	87	-
Longueur jonc (31)	55	-
Longueur totale	142	-

La présente invention propose donc une paillette munie d'un jonc d'identification pour la conservation par congélation d'embryons de mammifères, ledit jonc en matière

plastique 31 permettant de réaliser une identification précise de l'embryon placé dans la paillette 1 et de calibrer à volonté la bulle de gaz 7 tout en rendant le montage de ladite paillette 1 plus aisé. Il convient de remarquer que
5 le jonc 31 peut être réalisé en toute matière plastique compatible avec les fractions de la paillette 1. A titre d'exemple, ce jonc 31 est réalisé en polychlorure de vinyle, toutefois, il est bien entendu que toutes les matières similaires conviennent aussi. Les symboles d'identification sur
10 le jonc 31 peuvent être réalisées selon toutes manières convenables, par exemple ces identifications peuvent être imprimées en utilisant une matrice en caoutchouc.

La différence de largeur entre le corps 32 du jonc 31 et le corps de la paillette 1 peut varier à volonté,
15 té, cependant on préfère que le corps 32 du jonc 31 soit seulement légèrement supérieur au corps de la paillette 1.

L'invention n'est pas limitée au mode de réalisation représenté et décrit et elle englobe les différents équivalents techniques.

REVENDEICATIONS

1. Paillette pour la conservation par congélation d'embryons de mammifères dans un milieu de conservation capable d'être congelé et décongelé et comprenant une substance cryoprotectrice (ou cryoprotecteur) (4) qui pénètre à l'intérieur des cellules de l'embryon (4'), ladite paillette (1) étant scellée à ses deux extrémités (13, 14) jusqu'au moment de l'utilisation dans le mammifère, l'embryon (4') dans le milieu de conservation par congélation étant entouré respectivement :

(A) d'une part, successivement en direction d'une extrémité (13) (a) d'un mélange gazeux (5), (b) d'un milieu de culture (6) et (c) d'un premier bouchon extrême de scellement (2),

(B) et d'autre part, successivement en direction de l'autre extrémité (14) (d) d'une bulle de gaz (7), (e) d'une solution (8) d'au moins une substance miscible à l'eau, peu ou pas toxique à la température ambiante vis-à-vis de l'embryon (4') qui ne pénètre pas à l'intérieur des cellules de l'embryon (4') mais qui assure à l'extérieur de celui-ci une pression osmotique suffisante pour permettre une diffusion progressive du cryoprotecteur (4) à l'extérieur des cellules, la disposition étant telle que à la décongélation, l'embryon (4') dans son milieu de conservation est mis directement en contact avec la solution (8), (f) d'une autre bulle de gaz (9) et (g) d'un deuxième bouchon extrême de scellement (3) selon la revendication 1 du brevet principal, caractérisée en ce que le deuxième bouchon extrême de scellement (3) est un jonc (31) en matière synthétique dont le corps (32) est plus large que celui de ladite paillette (1) et dont l'extrémité (34) dudit jonc (31) provoquant l'éclatement de la bulle (7) qui lors de la décongélation s'élève le long de la fraction du milieu assurant la dilution du cryoprotecteur, est emmanchée à force par au moins un méplat dans l'une des extrémités (14) de la paillette (1) après son remplissage à raison d'une longueur qui est choi-

sie à volonté pour calibrer avec précision ladite bulle (7).

5 2. Paillette selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'extrémité (34) du jonc (31) assurant l'éclatement de la bulle (7) présente une forme de calotte sphérique (34a).

10 3. Paillette selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'extrémité (34) du jonc (31) assurant l'éclatement de la bulle (7) présente une forme de tronc de cône (34b).

4. Paillette selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'extrémité (34) du jonc (31) assurant l'éclatement de la bulle (7) présente une forme de cône (34c).

15 5. Paillette selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisée en ce que la forme en tronc de cône (34b) ou de calotte sphérique (34a) de l'extrémité (34) du jonc (31) est surmontée d'une courte pointe (34d).

20 6. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le corps (32) du jonc (31) comporte des symboles nécessaires à l'identification de la paillette (1).

25 7. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le jonc (31) est en matière plastique injectée.

8. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le jonc (31) est en polychlorure de vinyle.

30 9. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que l'emmanchement à force du jonc (31) est renforcé en soumettant la zone de jonction à une opération de soudage.

35 10. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que les rapports en volume et longueur des éléments constitutifs pour un volume global d'une paillette de 205 μ , se situent dans la gamme suivante :

	Fraction	Longueur en mm	Volume approximatif en μ l
	Embryon (4-4')	5	12
5	Mélange gazeux (5)	10	24
	Bulle de gaz (7) entre l'embryon (4-4') et la solution (8)	2,5	6
	Solution sucrose (8)	25	55
10	Milieu de culture (6)	25	55
	Bulle d'air termina- le (9)	2,5	6
15	Total paillette (1) sans bouchon (2)	70	<u>2</u> 160
	Longueur totale paillette (1) sans jonc (31)	87	-
	Longueur jonc (31)	55	-
20	Longueur totale	142	-

1/1

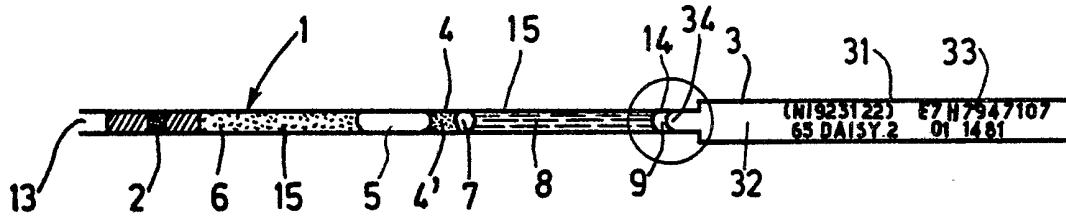


FIG.1

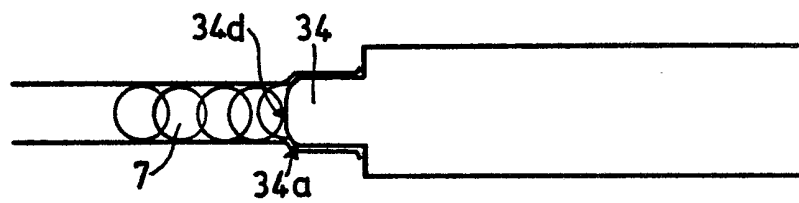


FIG.2

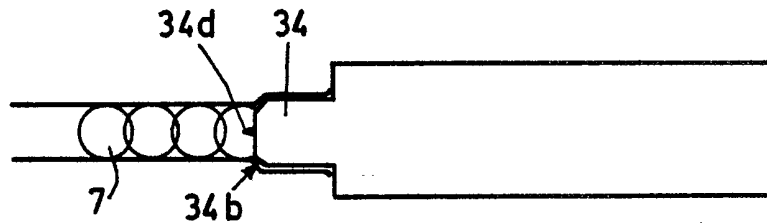


FIG.3

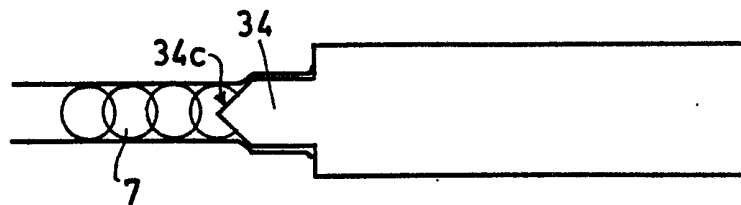


FIG.4