

## PROTOCOLE POUR TRANSFÉRER LES POISSONS DANS DE L'EAU FRAÎCHE STÉRILEMENT

1. Placer le milieu de culture E3 1X dans l'incubateur à 28,5 °C quelques minutes avant de commencer l'expérience.
2. Laver la table de travail.
3. Se laver les mains et mettre le sarrau.
4. Allumer le Beaker Bunsen et ajuster son intensité.
5. Prendre stérilement une nouvelle boîte de Pétri (si le poisson est sous forme embryonnaire) ou un nouveau contenant stérile et l'identifier adéquatement.
6. Sous forme embryonnaire :
  - a. Selon la méthode aseptique, mesurer un volume de 40mL de milieu de culture E3 1X à l'aide d'un tube à centrifugation de 50mL stérile.
  - b. Déposer 20 mL du E3 1X du tube à centrifugation dans la boîte de Pétri.
  - c. Si une pipette de plastique stérile est disponible, passer à l'étape 6 f). Sinon, poursuivre à la prochaine étape.
  - d. Dans une petite boîte de Pétri, insérer aseptiquement quelques millilitres de E3 1X.
  - e. Nettoyer l'intérieur d'une pipette de plastique de 2mL avec l'eau de l'étape 6 d) en faisant des mouvements de va-et-vient.
  - f. Si tous les embryons sont viables, poursuivre à la prochaine étape. Sinon, disposer de tous les œufs non viables dans un gants à l'aide de la pipette de plastique stérile.
  - g. À l'aide de la pipette de plastique, transférer les œufs dans la nouvelle boîte de Pétri contenant 20 mL de E3 1X en essayant d'incorporer le moins de vieille eau dans l'eau fraîche.
  - h. Ajouter plus ou moins 20 mL de E3 1X dans la nouvelle boîte de Pétri, tout dépendant de combien d'eau a été ajoutée pendant le transfert.
7. Sous forme de larve :
  - a. Compter le nombre de poissons vivants dans le contenant.
  - b. Calculer le volume de E3 1X qui sera nécessaire à ajouter au nouveau contenant stérile en considérant qu'un poisson doit baigner dans 10 mL d'E3 1X.
  - c. Selon la méthode aseptique, ajouter la moitié de ce volume dans le nouveau contenant stérile en le mesurant à l'aide d'un tube de centrifugation stérile de 50 mL.
  - d. Si une pipette de plastique stérile est disponible, passer à l'étape 7 g). Sinon, poursuivre à la prochaine étape.
  - e. Dans une petite boîte de Pétri, insérer aseptiquement quelques millilitres de E3 1X.
  - f. Nettoyer l'intérieur d'une pipette de plastique de 2mL avec l'eau de l'étape 7 e) en faisant des mouvements de va-et-vient.
  - g. Si tous les poissons sont viables, poursuivre à la prochaine étape. Sinon, disposer de tous les poissons non viables dans un gants à l'aide de la pipette de plastique stérile.
  - h. À l'aide de la pipette de plastique de 2mL, transférer les poissons dans le nouveau contenant stérile contenant la moitié du volume de E3 1X frais en essayant d'incorporer le moins de vieille eau dans l'eau fraîche. Si trop de vieille eau est insérée dans la nouvelle eau, enlever quelques millilitres d'eau à l'aide de la pipette de plastique.
  - i. Ajouter du milieu de culture E3 1X dans le nouveau contenant afin d'obtenir un volume correspondant approximativement au volume calculé à l'étape 7 b).
8. Au besoin, ajouter du PTU au milieu de culture contenant les poissons sous forme embryonnaire/de larve. Le traitement au PTU doit se faire toutes les 48 heures et doit avoir une concentration finale de 0,0002 M dans le milieu.
9. Refermer tous les contenants de manière aseptique et fermer la flamme Bunsen. Placer le contenant/la boîte de Pétri contenant les poissons/embryons dans l'incubateur à 28,5 °C. Jeter le gant contenant les poissons/embryons non viables dans la poubelle appropriée s'il y a lieu.

10. Placer la nouvelle boîte de Pétri/le nouveau contenant dans l'incubateur à 28,5 °C.
11. Placer le milieu de culture E3 1X dans le frigo ou en disposer adéquatement.
12. Vider la vieille eau dans le contenant à déchet approprié.
13. Laver son plan de travail.
14. Se laver les mains.

Points importants :

- Toujours se laver les mains avant et après les manipulations.
- Toujours laver l'espace de travail avant et après les manipulations.
- Toujours passer à la flamme les contenants lors leur ouverture ET de leur fermeture si c'est possible.
- Vérifier quelle pipette est disponible avant les manipulations.
- Est-il nécessaire de nourrir les poissons après l'exécution du protocole?
- Faut-il faire un traitement au PTU? (Est-ce que ça fait 48 heures qu'il a été fait?)
- Quelle poubelle doit être utilisée pour disposer de la vieille eau? (Est-ce qu'elle contient du PTU, du TMS, de l'eau de javel...?)
- La sortie de gaz doit TOUJOURS être fermée avant de quitter.
- Ne JAMAIS laisser une flamme sans surveillance.