

Protocole SpermBlue®

COLORATION POUR ANALYSER LA MORPHOLOGIE DES SPERMATOZOÏDES HUMAINS ET ESPÈCES ANIMALES

Contexte :

Cette coloration a été développée pour colorer toutes les structures des spermatozoïdes (acrosome, tête, pièce-intermédiaire, pièce principale de la queue et la pièce finale) en différentes intensités de bleue. La procédure de coloration est très simple et implique seulement deux étapes principales, la préparation/ coloration en seulement une solution (mois d'une minute) et l'immersion dans l'eau pendant trois à six secondes.

Contenu du SpermBlue® :

Tous les emballages de SpermBlue® contiennent une bouteille de 250ml avec la combinaison de fixative et de coloration suffisant pour colorer 500 échantillons de sperme sur des lames.

Il est recommandé d'effectuer la coloration des échantillons dans des conteneurs standardisés, par exemple les flacons Coplin en plastic/verre.

Si le SpermBlue® est conservé à 4°C, il durera un an ou plus. Le stockage à température ambiante (20 – 25°C) n'est pas obligatoire, mais normalement il dure, au moins, un an. Prenez note de la date de péremption.

Procédure de coloration :

Pour obtenir des résultats optimaux, nous recommandons de laver les échantillons avant de commencer la procédure (ex : mélangez 200 µl d'échantillon frais avec 400µl de PBS et centrifugez à 300g durant 10 min. Enlevez le surnageant et diluez le pellet avec du PBS afin

d'avoir une concentration de travail d'environ 50 million/ml, ou celle qui soit confortable pour le technicien qui fait l'analyse).

Étape 1 : préparez un frottis en utilisant 10 µl de sperme frais ou de 10 à 15 µl de sperme après migration/ sperme lavé (adaptez le volume à la concentration de spermatozoïdes) et laissez sécher à l'air. L'angle de glissement idéal qui est utilisé pour faire un frottis est d'environ 45°. *Pour plus d'informations, vérifiez le manuel de l'OMS 6^{ème} édition.*

Si la concentration de spermatozoïdes est inférieure à 20 millions/ml, 1) utilisez 15 µl de sperme pour le frottis, et 2) diminuez l'angle de glissement qui est utilisé pour faire le frottis à environ 20°. De cette manière, il y aura plus de spermatozoïdes sur la lame.

Assurez-vous que le frottis soit totalement sec avant la prochaine étape.

Étape 2 : plongez soigneusement le frottis séché verticalement dans le flacon (pot de type Coplin) contenant le fixateur/coloration SpermBlue® à 20 à 25 °C.

Temps de coloration de référence pour différentes espèces :

Humain/Primate	50 secs
Verrat/Chevaux/Rat	1 min
Taureau/Chien/Mouton	2 min

Alternative : plongez la lame pendant 45 secondes dans le **SpermBlue®** et lavez-la pendant 5 secondes dans de l'eau distillée.

Notez que ces temps de coloration peuvent varier en fonction de la température du laboratoire, de l'humidité ou du pH de l'eau déminéralisée utilisée pour le lavage des lames. Il faut juste trouver la meilleure technique propre à votre laboratoire.

Étape 3 : retirez soigneusement la lame du flacon et maintenez-la à un angle de 60° à 80° en contact avec une serviette papier pour enlever l'excès de coloration.

Étape 4 : plongez lentement la lame colorée dans un flacon Coplin contenant de l'eau distillée, deux fois pendant trois secondes chacune et laissez l'excès de liquide s'écouler sur le papier. Laissez sécher verticalement. Assurez-vous que l'angle de la lame soit d'environ 60° et que la coloration ne soit pas « aspirée » de la lame par le papier.

Étape 5 : si la couleur bleue n'est pas assez intense, colorez pendant encore 5 à 10 secondes. Si le bleu est trop intense, colorez seulement pendant 40 secondes et plongez dans de l'eau déminéralisée pendant 3 secondes (en effectuant des mouvements circulaires très doux dans le flacon Coplin pour enlever l'excès de colorant).

Étape 6 : assurez-vous que la lame soit entièrement sèche, puis montez-la avec du DPX, Eukitt ou une colle de montage équivalente pour les conserver. Les étapes à suivre pour monter sont les suivantes :

1. Mettez deux gouttes d'Eukitt sur la lamelle.
2. Ensuite, placez la lame à l'envers sur la lamelle.
3. Appuyez sur la lame pour étendre la colle de montage.
4. Laissez sécher le frottis monté horizontalement, la lamelle étant vers le haut.

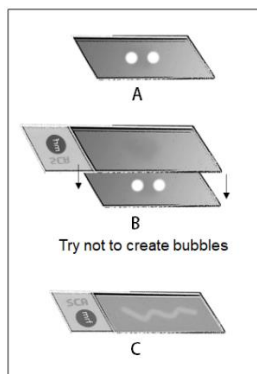


Figure 2 : Montage avec Eukitt.

Commentaires importants :

Les premiers résultats de coloration peuvent donner une coloration trop faible de certains spermatozoïdes ainsi que des différences d'intensité de coloration sur la même lame. Chaque chercheur doit expérimenter pour optimiser ses résultats dans ce contexte. Essayez d'adapter les temps de coloration à des conditions de température comprises entre 20 et 25 °C.

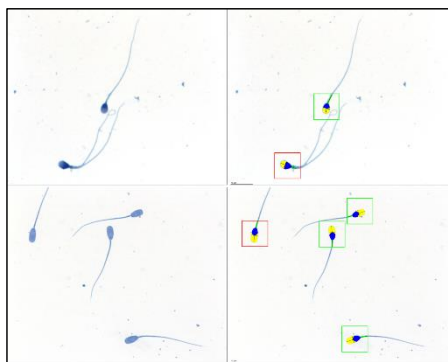
De nombreuses techniques de coloration du sperme existantes reposent sur la « peinture du sperme » qui n'est pas acceptable du point de vue cytologique. SpermBlue® différencie clairement toutes les sous-divisions du sperme avec précision et est particulièrement efficace dans l'identification de l'acrosome du sperme (van der Horst and Maree, [2009] **SpermBlue®**: A new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis, Biotechnique and Histochemistry 84:299-308).

Exemple :

Pour les spermatozoïdes de primates humains et sous-humains, des chevaux et dauphin,

l'acrosome est coloré en bleu clair et la tête en bleu foncé. La pièce intermédiaire se teint distinctement en bleu foncé, le reste du flagelle en bleu légèrement plus clair et l'embout en bleu encore plus clair.

Chez les animaux domestiques tels que le taureau, le verrat et le mouton : l'acrosome se colore en bleu foncé, la zone post acrosomale et en particulier la zone équatoriale se colore en bleu clair. La pièce intermédiaire se colore d'un bleu plus foncé et le reste du flagelle est légèrement moins bleu foncé.



À gauche, des spermatozoïdes humains (en haut) et de verrat (en bas) colorés au SpermBlue®. À droite, les champs correspondants analysés avec le Sperm Class Analyzer (SCA).

Fiche de données de sécurité pour SpermBlue® :

SpermBlue® contient des composants toxiques comme tous les colorants cytologiques mais n'est pas dangereux. Le principal composant actif est un léger irritant cutané, oral/nasal et la coloration doit de préférence avoir lieu sous une hotte. En cas de contact cutané, laver soigneusement la zone affectée avec de l'eau.

Précautions :

Toutes les colorations cytologiques sont toxiques et doivent être manipulées avec précaution. Travaillez toujours avec des gants et de préférence sous une hotte. Ne teindre que lorsque les spermatozoïdes sont fixés (morts). NE PAS l'utiliser pour les cellules vivantes non fixées.

Références :

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2021, Sixth edition. Geneva: World Health Organization All rights reserved. Publications of the World Health Organization Press, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland.