 INRA Institut National de la Recherche Agronomique Centre de Tours Unités Avicole	Imprimé le 04/10/2012	N° d'identification : 0083-MO-0001
	Mode opératoire	Version : a
		N° interne :
Coloration des spermatozoïdes morts-vivants à l'éosine-nigrosine		
Date d'émission : 22/07/1999	Dernière mise à jour : 22/07/1999	Date de retrait :
Fichier informatique :		Nombre de pages : 4
Rédigé par : I. Grasseau	Revu par : E. Blesbois	Approuvé par : Le chef de service: Le responsable agr:
Diffusion : labo elisaisa		

Attention ! Vérifiez sur le serveur que vous avez en main la dernière version valide.

SOMMAIRE

- 1- Objet et Domaine d'application
- 2- Principe
- 3- Reactifs
- 4- Appareillage
- 5- Mode opératoire
- 6- Expression des résultats
- 7- Références
- 8- Annexes

1) OBJET ET DOMAINE D' APPLICATION:

Détermination de la qualité du sperme par comptage de proportions de spermatozoïdes morts ou vivants après coloration vitale, doublé d'un comptage des formes anormales des spermatozoïdes . Cette méthode est appliquée ici aux spermatozoïdes d' oiseaux.

2) PRINCIPE

L'éosine est un colorant qui pénètre dans les cellules mortes. Les spermatozoïdes vivants ne prennent pas la coloration par l'éosine, ils apparaissent blancs sous le microscope. Les spermatozoïdes morts colorés par l'éosine sont visibles en rose sous le microscope. Les spermatozoïdes qui apparaissent colorés partiellement sont considérés comme morts. (cela de façon conventionnelle). Les formes anormales blanches (annexes 1) seront considérées comme une population différente.

La nigrosine est le colorant de fond.

3) REACTIFS:

(Les fournisseurs sont donnés à titre indicatif)

3-1 Eosine poudre (merck)

3-2 Nigrosine, poudre (sigma)

3-3 H₂O distillée ou déminéralisée

3-4 Citrate de potassium (sigma)

3-5 Glutamate de sodium (sigma)

3-6 Chlorure de magnésium (sigma)

3-7 Fructose (sigma)

3-8 Dipotassium hydrogénophosphate K₂HPO₄·3H₂O (sigma)

3-9 Monophosphate de potassium KH₂PO₄ (sigma)

3-10 TES (sigma)

3-11 Acetate de sodium (sigma)

Préparation de solution :

-Pour 100ml de BPSE:

Citrate de potassium 0,064gr

Glutamate de sodium 0,807gr

Chlorure de magnésium 0,034gr

Fructose 0,5gr

Dipotassium hydrogénophosphate K₂HPO₄·3H₂O 1,27gr

Monophosphate de potassium KH₂PO₄ 0,065gr

TES 0,395gr

Acetate de sodium 0,43gr

Ajuster à PH7,3-7,4; POSM:340-350 mosm

- Faire une solution de: 1,6gr éosine

6gr nigrosine dans 100ml de BPSE

- Agiter à 20°C sur un agitateur pour diluer le plus possible les grains de colorant pendant 15 mn

- Centrifuger la solution 15 mn à environ 2500g puis prélever le surnageant qui doit être homogène.

- Filtrer le surnageant de façon à éliminer les grains de colorants.

4) APPAREILLAGE

- 4-1 Lames dégraissées
- 4-2 Lamelles
- 4-3 Microscope+ objectif 100 à immersion
- 4-4 Bain de glace
- 4-5 Minuteur
- 4-6 Sèche cheveux
- 4-7 Papier filtre
- 4-8 Entonnoir
- 4-9 Centrifugeuse
- 4-10 Agitateur magnétique et barreaux d' agitation

5) MODE OPERATOIRE

5-1 Coloration des spermatozoïdes

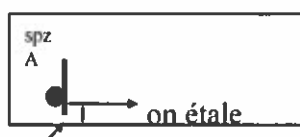
Pour du sperme dilué au 1/2 et ayant une concentration en spermatozoïdes au départ d'environ 5 milliards par millilitres, préparer des tubes avec 10 gouttes (200 µl) de colorant, mettre les tubes dans de la glace fondante. Si la concentration initiale est très différente des valeurs précisées ici , il faut les adapter de façon que les frottis soit lisibles.

Dans chaque tube ajouter 20µl de sperme dilué (1 goutte) et mélanger doucement.

Après deux minutes d' incubation dans la glace fondante faire deux frottis pour un même échantillon , chacun avec une goutte du mélange sperme - colorant.

5-3 Préparation des frottis

Après avoir identifié la lame, déposer une goutte sur le bord de la lame, prendre une lamelle avec laquelle on étalera la goutte () en partant du milieu de la goutte vers le bord opposé de la lame.



lamelle



ATTENTION, la coloration du frottis doit être d' un rose très légèrement violacé, si elle est trop violette les spermatozoïdes vivants peuvent être colorés. Si elle ne l' est pas assez, l' inverse se produira .Tout ceci est conventionnel , c' est à l' opérateur de s' étalonner et de travailler ensuite toujours de la même façon. L'intensité de la coloration dépend de la taille et de la manière dont la goutte est étalée. un dépôt de 20µl en bout de lame suffit.

Sécher les lames avec un sèche-cheveux soufflant.

5-4 Observation

Cette dernière se fera au microscope avec un objectif à immersion grossissement environ 150 et l'on comptera 300 spermatozoïdes par lame.

Parallèlement aux morts et vivants observer les anormaux et les répertorier par classe. Morts, vivants et anormaux-vivants. Si têtes et flagelles sont séparés ne compter que les têtes.

6) EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats sont exprimés en proportion de spermatozoïdes morts (colorés) , vivants (non colorés) ou vivants anormaux. Les différentes anomalies rencontrées (pliures, cassures au niveau de la pièce intermédiaire, gonflement de la membrane plasmique, décondensation du noyau , perte de la fraction externe de l' acrosome ou de l' acrosome complet, perte du flagelle...) peuvent être répertorié par classe.

7) REFERENCES:

7.1

E.Blom, A one minute live -dead sperm stain by means of eosine -nigrosine.Fert Steril 1,(176-177),1950

7.2

Lake P.E, Ravie O,Effect on fertility of storing fowl semen for 24H at 5°C in fluids of different pH .Journal of reproduction and fertility: 57, 143-155, 1979


7.3

Sexton TJ. A new Poultry Semen Extender 2. Effect of the diluent components on the fertilizing capacity of chicken semen stored at 4°C.Poultry Science: 57, 277-284,1977

8) ANNEXE

Photos des spermatozoïdes anormaux

Imprimé le 14/01/2008

 INRA Institut National de la Recherche Agronomique Centre de Tours Station de Recherches Avicoles	Mode opératoire	N° d'identification : 0083-MO-0071
		Version : A
		N° interne :
Congélation d'éjaculats individuels de coq en paillettes		
Date d'émission : 20/6/2003	Dernière mise à jour : 20/6/2003	Date de retrait :
Fichier informatique : Isabelle/proc repro référencées		Nombre de pages : 6
Rédigé par : F.Seigneurin	Revu par : I.Grasseau	Approuvé par : Y.Nys
Diffusion : Laboratoire Elisaisa, F.Seigneurin		

Mots clés : congélation, semence, paillette, glycérol

SOMMAIRE

- 1- Objet et Domaine d'application
- 2- Principe
- 3- Réactifs
- 4- Appareillage et équipement
- 5- Mode opératoire
- 6- Hygiène et sécurité
- 7- Références
- 8- Annexe

Attention ! Vérifiez sur
le serveur que vous
avez en main la
dernière version valide.

1) OBJET ET DOMAINE D' APPLICATION

Conservation de la semence de coq dans l'azote liquide, en éjaculats individuels, dans un but de gestion *ex situ* de patrimoine génétique en banque de sperme.

2) PRINCIPE

Après la collecte du sperme suivant la méthode préconisée de Burrows et Quinn(1936), le sperme est dilué et subit une première descente de température à 4°C avant l'ajout du cryoprotecteur (glycérol). Après la mise en paillettes, la congélation se fera à l'aide d'un congélateur programmable qui permet de descendre en température par paliers jusqu'à -140°C. Les paillettes sont ensuite stockées à -196°C. Elles pourront être décongelées pour des inséminations ou des dosages en laboratoire.

3) REACTIFS

Les fournisseurs sont donnés à titre indicatif.

Acétate de magnésium (Sigma)
Glutamate de sodium (Sigma)
Acétate de potassium (Sigma)
Fructose (Sigma)
B.E.S (Sigma)
P.V.P (Sigma)
Soude (Sigma)
Gluthatione-SH (Sigma)
Eau déminéralisée
Glycérol (Sigma)

Préparation du dilueur

1 Litre de dilueur Lake précongélation (LPC)

Acétate de magnésium (0,7g)
Glutamate de sodium (19,2g)
Acétate de potassium (5,0g)
Fructose (8,0g)
B.E.S (1,0g)
P.V.P (3,0g)
Soude (4,0ml)
Gluthatione-SH (0,5g)
Ajuster à 1 litre dans une fiole jaugée, avec de l'eau déminéralisée.

PH=7.1

Pression osmotique = 340 mosm

4) APPAREILLAGE ET EQUIPEMENT

Collecteurs individuels de sperme (5)
Fioles Packards
Micropipettes de 1ml, 10ml, 200µl
Chambre frigorifique à 4°C
Deux fioles jaugées de 1 litre
Barreaux d'agitation
Agitateur rotatif programmable
Agitateur magnétique
Paillettes de 0,5ML
Marguerites et visotubes pour l'intérieur des bidons de stockage
Poudre pour souder les paillettes
Peigne à bulles
Rack pour supporter les paillettes dans le congélateur
Congélateur programmable avec informatique et imprimante couplée
Tank de mise en pression de l'azote liquide
Système de soutirage d'azote

Bidon de stockage des paillettes
Azote liquide
Boîte de mouchoirs
Gants et lunettes de protection
Feuille de congélation (Annexe I)
Balance (précision 1mg)

5) MODE OPERATOIRE

5.1 Nombre de coqs par congélation

Le maximum de coqs possible pour une séquence de congélation est de 5. Au delà de ce nombre le délai entre collecte et congélation risque d'être trop long et d'altérer la qualité du sperme.

5.2 Préparation du matériel

La veille de la congélation:

Préparer le dilueur et le stocker à 4°C.

Mettre en chambre froide (4°C) : l'agitateur rotatif, les béchers, les cônes jetables des pipettes, les pipettes, une poubelle, des mouchoirs en papier, les paillettes, la poudre à sceller les paillettes, le peigne à bulles, le rack.

Vérifier ou faire la programmation du congélateur

Vérifier le stock d'azote liquide dans le tank de mise en pression.

Préparer un tube de 5 ml pour chaque coq récolté. Les tubes de récolte doivent être marqués au numéro du coq.

Préparer une fiole en verre (type Bécher de 5 ml) pour chaque coq récolté. Les fioles doivent être marqués au numéro du coq.

5.3 Préparation des coqs

Les coqs doivent avoir été plumés autour du cloaque et avoir été mis à jeun (aliment et eau) au moins 10 h avant la collecte. En pratique il est plus simple de collecter les coqs le matin dès l'allumage de la lumière puis de les nourrir et abreuver après la collecte et de couper l'eau avant l'extinction.

5.4 Rythme de collecte

Lors des phases de testage et de congélation, **les coqs doivent être récoltés 2 fois par semaine**, avec 3 ou 4 jours de repos entre deux collectes.

5.5 Récolte du sperme

La récolte simultanée de la semence de 5 coqs s'effectue par massage suivant la méthode de Burrows et Quinn dans 5 tubes numérotés tarés (un éjaculat par tube) sur 200 µl de dilueur LPC à 20°C.

L'opérateur 2 vérifie la concordance entre le numéro du coq et le numéro du tube.

Il récolte alors le sperme dans le tube par aspiration grâce au bouchon récolteur.

5.6 Congélation

1) Chaque éjaculat de semence diluée est pesé, on notera les poids des tubes sur la feuille de congélation.

2) Placer les 5 tubes de sperme à 4°C pendant 10 mn.

3) Calculer le volume de l'éjaculat (poids du tube plein – 200 µl – poids du tube vide).

4) Préparer, dans les fioles en verres, pour chaque éjaculat, une deuxième fraction de dilueur de quantité adéquate de façon à obtenir une dilution finale de 1/3.

5) Y ajouter le glycérol au taux de 11% du volume total.

6) Placer les en chambre froide à 4°C (10 mn) sur l'agitateur rotatif pour homogénéiser.

Les étapes 7 à 12 s'effectuent en chambre froide à 4°C.

7) Pipeter chaque éjaculat et l'ajouter à sa deuxième fraction de dilueur glycérolé.

8) Equilibrer 10 minute à 4°C avec agitation moyenne (120 tours/mn).

9) Mettre en paillettes de 0,5 ml. Les paillettes doivent être identifiées aux numéros des coqs. Un code couleur est possible.

10) Faire une bulle d'air dans chaque paillette avec le peigne à bulles.

11) Sceller les paillettes avec la poudre d'alcool polyvinylique.

12) Placer les paillettes sur leur rack.

13) Transférer les paillettes dans le congélateur programmable.

14) Congeler à la vitesse de -7°C/mn de +4°C à -35°C
-60°C/mn de -35°C à -140°C

15) Transférer les paillettes dans le bidon de stockage d'azote liquide à l'intérieur du visotube et des marguerites prévues.

6) HYGIENE ET SECURITE

Pour toute manipulation d'azote liquide mettre gants et lunettes de protection.

7) REFERENCES

Burrows and Quinn, 1936. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poultry Science 16: 19-24.

Chalah, T.; Seigneurin, F.; Blesbois, E.; Brillard, J.P. 1999. In vitro Comparison of Fowl Sperm Viability in Ejaculates Frozen by Three Different Techniques and Relationship with Subsequent Fertility in vivo. Cryobiology 39, 185-191.

Seigneurin, F., Blesbois, E. 1995. Effects of freezing rate on viability and fertility of frozen – thawed fowl spermatozoa. Theriogenology, 43 1351-1358

Tselutin, K. ; Seigneurin, F. ; Blesbois, E. 1999. Comparison of Cryoprotectants and Methods of Cryopreservation of Fowl Spermatozoa. Poultry Science 78 : 586-590

8) ANNEXES

Annexe I : fiche technique de congélation

FICHE TECHNIQUE DE CONGELATION


N° coq	Coul. paill.	Poids (mg)	Tare (mg)	Volume (µl)	Dilueur 1	Dilueur 2	V total (µl)	Cryoprot. (µl)	Remarques	Nombre paillettes
1	Transp.									
2	Jaune									
3	Bleu									
4	Rose									
5	Mout.									
6	Saumon									
7	Orange									
8	Grise									
9	Violette									
10	Verte									
11	Rouge									
12	Transp.									
13	Jaune									
14	Bleu									
15	Rose									
16	Mout.									
17	Saumon									
18	Grise									

Poids : poids du tube de collecte contenant chaque éjaculats.

Tare : poids du tube vide.

Volume : volume de l'éjaculat.

Imprimé le 04/10/2012

 INRA Institut National de la Recherche Agronomique Centre de Tours Station de Recherches Avicole	Mode opératoire	N° d'identification : 0083-MO-0044
		Version : A
		N° interne :
<i>Coloration vitale des spermatozoïdes de coqs et de dindons avec deux sondes fluorescentes SYBR14/IP</i>		
Date d'émission : 17/6/2003	Dernière mise à jour :	Date de retrait :
Fichier informatique : Isabelle/procédure sous aqr		Nombre de pages : 5
Rédigé par : I.Grasseau	Revu par : E.Blesbois JP.Brillard	Approuvé par : Y.Nys
Diffusion : labo Brillard, labo Blesbois		

Attention ! Vérifiez sur le serveur que vous avez en main la dernière version valide.

Mots clés : fluorescence, sybr14/IP, spermatozoïdes

SOMMAIRE

1. **Objet - Domaine d'application**
2. **principe**
3. **réactifs**
4. **appareillage**
5. **mode opératoire**
6. **expression des résultats**
7. **hygiène et sécurité**
8. **références bibliographique**

1) OBJET ET DOMAINE D' APPLICATION:

Méthode d'évaluation de la viabilité des spermatozoïdes à l'aide d'un fluorochrome nucléaire, l'iodure de propidium (IP) qui ne pénètre que lorsque les cellules sont dites « mortes » et d'un colorant fluorescent de fond, le SYBR14 qui colore l'ensemble des cellules. Cette coloration peut *a priori* s'appliquer à toute cellule vivante mais elle doit être à chaque fois validée. Elle est recommandée (car déjà validée) pour les spz de mammifères (voir travail de Garner et al, 1995) et d'oiseau (dindon: Donoghue et al, 1995; coq: Chalah et Brillard, 1998;) ainsi que pour le sperme congelé d'oiseau (voir Chalah et al, 1999).

2) PRINCIPE

L'iodure de propidium (IP) est un colorant d'exclusion qui rentre dans la cellule lorsque l'intégrité de la membrane est altérée. IP colore alors électivement le noyau en rouge. Le Sybr14 est un colorant supra vital qui pénètre les membranes plasmiques des spermatozoïdes quel que soit leur état (fonctionnel ou non). En l'absence d'un autre colorant, Sybr14 se fixe sur l'ADN et colore celui-ci en vert.. Ces deux colorants fluorescents sont des marqueurs spécifiques des noyaux. En présence d'une source d'énergie (habituellement fournie par une lampe à mercure de 50 ou 100 Watts), ces fluorochromes, s'ils sont fixés à leur molécule d'intérêt, sont excités par une longueur d'onde dite d'excitation (ils absorbent alors de l'énergie longueur d'onde donnée dite longueur d'onde d'excitation) et restituent l'énergie photonique à une longueur d'onde plus élevée (dite longueur d'onde d'émission. Lors de l'émission, la restitution d'énergie sous forme de photons est visible sous un microscope équipé d'une lampe fluorescente. Il est alors possible de visualiser les éléments sub-cellulaires (ici, les noyaux) ayant "fixé" le ou les fluorochromes et, éventuellement, de les compter avec un microscope à fluorescence équipé des filtres correspondants aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission du ou des fluorochromes concernés.

3) REACTIFS

Les fournisseurs sont donnés à titre indicatif.

3-0 Pour préparer le dilueur Lake 7.1 : pour 1 litre

- 3-1 0.8 gr Acétate de magnésium (Sigma ref M-0631):
- 3-2 1.28 gr Citrate tri potassique (Sigma ref :C-8385)
- 3-3 15.2 gr L glutamate de sodium (Merck ref : 106445)
- 3-4 6 gr glucose (Sigma G-7528°)
- 3-5 30.5 gr BES (Sigma B-6420)
- 3-6 58 ml NAOH 1N (prolabo)

3-7 Diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma ref : D-5879)

3-8 SYBR 14 (Molecular Probes. Inc-Eugene, Orégon, USA = kit :live /dead, sperm viability ref:L7011

3-9 Iodure de propidium (IP) (vendu avec le kit du sybr 14)

4) APPAREILLAGE

- 4-1 Microscope avec lampe à mercure de 50 ou 100W
- 4-2 Objectif Fluo X40
- 4-3 Oculaire X10
- 4-4 Optovar X1.25 (soit, avec l'objectif 40, un grossissement final de $40 \times 10 \times 1.25 = 500$ fois)
- 4-5 Lames standard
- 4-6 Lamelles
- 4-7 tube eppendorf de 0.5 ou 1ml
- 4-8 chronomètre
- 4-9 Micro pipette de 10 μ l, 1000 μ l, 200 μ l
- 4-10 Fiole jaugée 1l
- 4-11 becher
- 4-12 Osmomètre
- 4-13 Phmètre
- 4-14 Collecteur de semence
- 4-15 Spectrophotomètre
- 4-16 cuve à spectrophotomètre
- 4-17 gants en latex

5) MODE OPERATOIRE

5-1: Préparer du dilueur Lake7.1 (Lake et Ravie, 1979)

Mélanger les réactifs et compléter avec de l'eau déminéralisée

- 0.8 gr Acétate de magnésium
- 1.28 gr Citrate tri potassique
- 15.2 gr L glutamate de sodium
- 6 gr glucose
- 30.5 gr BES
- 58 ml NaOH 1N

Amener le PH à 7.1

Osmolarité=370

5-2 KIT DE COLORANT= Les fluorochromes sont des produits très dangereux il faut porter des gants pendant toutes les manipulations de ses colorants. , ce qui n'empêche pas de se laver soigneusement les mains avant de prendre un repas!

Concentration initiale du kit

Colorant A= Sybr 14= 1mMole dans 100 μ l DMSO

Colorant B= IP = 2.4mMole dans 5 ml d' H₂O

Préparation des solutions de stockage

Diluer au 1/20 le sybr 14 dans du DMSO soit 1mMole dans 2000 μ l de DMSO= 0.5 μ M/ μ l

Aliquoter dans des tubes (type eppendorf de 0.5 ou 1ml) IP et le Sybr, les conserver congelé à -20°C

5-3

Collecter la semence suivant la procédure 0083-PR-0043, prendre sa concentration à l'aide du spectrophotomètre et ramener les concentrations à 25 millions de spermatozoïdes par ml
par ex :

DO=540=5.6 milliards spz/ml

Soit $5600/25=224$ de dilution

soit 1 μ l pour 223 μ l de dilueur Lake 7.1 (en pratique, travailler avec au minimum 10 μ l de sperme pour optimiser la précision du pipetage)

soit 10 μ l de semence fraîche et pure pour 2230 μ l de dilueur L7.1

soit 20 μ l de semence fraîche et pure pour 4460 μ l de dilueur L7.1

5-4

La coloration

Penser à allumer la lampe à fluorescence du microscope 5-10mn avant le début de la coloration

Prendre 500 μ l de la solution de semence à 25 millions, à laquelle on ajoute 4 μ l de Sybr 14

Incuber à l'obscurité à température ambiante 10mn

Puis ajouter 4 μ l d' IP

Incuber 5mn à l'obscurité

Puis lire tout de suite sous le microscope deux lames par éjaculats à raison d'un comptage de 300 spermatozoïdes par lame

6) RESULTATS

6-1 Comptage de trois populations de spermatozoïdes

Les spermatozoïdes verts sont viables (cellule sybr 14+)

Les spermatozoïdes rouges sont morts (cellules IP +)

Les spermatozoïdes à double marquage (vert et rouge): chez les oiseaux, les comptabiliser avec les IP+ (non viable)

N.B: attention de ne pas laisser les préparations trop longtemps (>3mn) entre lame et lamelle car la proportion d'IP+ et d' IP+/Sybr14+ augmente très vite et peut donc entraîner des artéfacts de viabilité et de comptage.

7) HYGIENE ET SECURITE:

7-1 porter des gants pendant toute la manipulation.

7-2 Jeter les tubes de fluorochrome dans les poubelles prévues à cet effet

8) REFERENCES:

Blom E, 1950. A one minute live-dead sperm stain by means of eosin+nigrosin. Fertil. Steril. 1: 176-177.

Chalah T., Brillard JP, 1998. Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence(Sybr14/PI) . Theriogenology 50: 487-493.

Chalah T, Seigneurin F, Blesbois E, Brillard JP, 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, 39: 185-191.

Donoghue A.M., Garner D.L., Donoghue D. J., Johnson L;A., 1995. Viability assessment of turkey sperm using fluorescent staining and flow cytometry. *Poultry Sci.* 74/ 1191-1200.

Garner D.L., Johnson L. A, 1995. Viability assessment of mammalian spermatozoa using Sybr14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.* 53, 276-284.

Lake et Ravie, 1979 Effect on fertility on storing fowl semen for 24h to 5°C in fluids of different PH *J.Reprod . Fert* .57,71-77

Métézeau et al., 1988 La cytométrie en flux pour l' étude de la cellule normale ou pathologique .Ed . Medsi/Mc Graw- hill

Mixner JP, Saroff J, 1954. Interference by glycerol with differential staining of bull spermatozoa. *J. Dairy Science* 37: 652.