# OBJET

Mode opératoire décrivant la réalisation de l’étalement des spermatozoïdes pour analyse de la fragmentation de l’ADN spermatique ou l’équipement chromosomique des gamètes par FISH (hybridation *in situ* fluorescente).

# PERSONNEL CONCERNE

Biologistes, Techniciennes et Internes de Biologie de la Reproduction.

# PRE-ANALYTIQUE

Les rendez vous sont fixés par les secrétaires selon le document Prise de Rendez-vous / Qplanner/ BDR **(LAB-BAMP-BDR0-MOP-020)**

**L’accueil du patient est identique** à : Mode Opératoire - Spermogramme Spermocytogramme Test de Migration et Survie **(LAB-BAMP-BDR1-MOP-008)**

**VERIFIER LES DOCUMENTS :**

- Ordonnance indiquant « Fragmentation de l’ADN » (pour la Cytogénétique)

- Questionnaire Patient spermogramme et/ou analyse de la fragmentation de l’ADN spermatique **(Réf : LAB-BAMP-BDR1-ENR-004)**

- Demander au patient les indications de l’analyse de la fragmentation : fausse couches à répétition, exposition à des toxiques, échecs de FIV …

- **Pour une FISH** : vérifier que l’on ait le caryotype et la raison de la demande. Une consultation biologique peut être prévue pour vérifier ces éléments.

**DONNER AU PATIENT**

**- 1 réceptacle** pour faire le prélèvement de sperme par masturbation

**DEMANDER AU PATIENT**

- De s’isoler dans la pièce de prélèvement avec le réceptacle.

- De suivre les instructions pour prélèvement de sperme **(LAB-BAMP-BDR0-INF-003)**

# ANALYTIQUE

**Remarques**

**- pour une FISH** : prévoir 15 lames, si possible.

**- pour une analyse de la fragmentation de l’ADN spermatique** : prévoir 9 lames, si possible.

- Les lames doivent être préparées en fin de matinée ou début d’après-midi afin que le temps de séchage soit suffisant.

**Solutions**

\* PBS 1 X : Prêt à l’emploi, à température ambiante, pièce 121 (réserve en cytogénétique).

\* Fixateur Carnoy : 3V méthanol / 1V acide acétique (pièce 123)

Dans 1 borel soit 60 mL de méthanol + 20 mL d’Acide acétique

🖝 ***Toujours verser l’acide acétique dans le méthanol.***

**TECHNIQUE**

- Prévoir un tube conique en plus lors de la préparation de la paillasse la veille.

- Réserver **3 petites étiquettes « patients »** pour les porte-lames (5 pour une FISH).

- Réaliser une numération et une mobilité sur le prélèvement de départ.

1 - Réserver 0,5 à 1 mL de sperme dans un tube conique (1 mL de sperme si mauvaise numération)

🖝 ***Si la numération de départ est inférieure à 1 million de spermatozoïdes/mL, contacter Aurore PERRIN pour savoir si on peut quand même réaliser l’examen.***

2 - Y ajouter 2 mL de PBS 1X

- Homogénéiser doucement

- Centrifuger à 700 G pendant 5 min

- Enlever le surnageant

3 - Ajouter à nouveau 2 mL de PBS 1X

- Homogénéiser doucement

- Centrifuger à 700 G pendant 5 min

- Enlever le surnageant

4 - Ajouter dans un premier temps 300 µL à 1mL de PBS 1X sur le culot.

🖝 *On peut aller jusqu’à 2 mL si sperme très riche*

- Homogénéiser

5- Préparer des lames avec Nom, Prénom et Date de la technique (possibilité de les préparer la veille)

🖝*Écrire dans la moitié inférieure de la partie dépolie (voir schéma)*

6 - Déposer 25 µL sur 1 lame et étaler (par glissement avec une autre lame **à plat,** sans écraser les spermatozoïdes) de façon à avoir environ 20 spermatozoïdes / champ au grossissement X400.



*🡺 Si la concentration par champ est OK*, étaler de la même façon les autres lames :

\* 9 au total pour fragmentation

\*15 au total pour FISH

*🡺 Si peu de spermatozoïdes (entre 1 et 3 millions/mL)* : pour 5 lames, étaler la goutte avec un cône en concentrant le frottis et faire les 4 autres lames en étalement par glissement.

Attention s’il y a beaucoup de cellules rondes, ne faire que 2 lames concentrées et les 7 autres en étalement.

- Séchage des lames à l’air libre.

7 - Une fois les lames bien sèches (aspect de « fougère » au grossissement x400) les fixer 1 nuit dans le Carnoy.

8 - Le lendemain, sortir les lames du Carnoy **sans** les rincer et les laisser sécher verticalement sur un papier absorbant.

**🖝** *Si technique du vendredi : possibilité de laisser les lames jusqu’au lundi matin, en filmant le borel pour éviter l’évaporation du Carnoy.*

9 - Mettre les lames dans les portes-lames étiquetés.

10 - Faire une photocopie du bilan, de l’ordonnance « Frag ou FISH » et du questionnaire.

**🖝 Si FISH, fournir le résultat du caryotype**.

- Joindre les lames et mettre le tout sous enveloppe pour le laboratoire de Cytogénétique.

- Dans Médifirst indiquer que l’examen « Fragmentation de l’ADN ou FISH sur spermatozoïdes » a été transmis.

- Prévenir le laboratoire de Cytogénétique et conserver l’enveloppe à +4°C dans le réfrigérateur de spermiologie, pièce 118, en attendant que la cytogénétique vienne récupérer le tout.

**🖝** *Les lames peuvent se conserver quelques jours à 4°C si nécessaire*.