



Mise en place d'une barrière hémato-testiculaire in vitro comme méthode alternative et complémentaire à l'expérimentation animale pour l'étude des effets des perturbateurs de la fonction endocrinienne

Audrey Legendre, Sophie Desmots, Anthony Lecomte, Franck Robidel, Olivier Dupont, Pascal Froment, René Habert, Emmanuel Lemazurier

► To cite this version:

Audrey Legendre, Sophie Desmots, Anthony Lecomte, Franck Robidel, Olivier Dupont, et al.. Mise en place d'une barrière hémato-testiculaire in vitro comme méthode alternative et complémentaire à l'expérimentation animale pour l'étude des effets des perturbateurs de la fonction endocrinienne. 25. Congrès de la Société d'Andrologie de Langue Française (SALF 2008), Sep 2008, Hammamet, Maroc. ineris-00970396

HAL Id: ineris-00970396

<https://ineris.hal.science/ineris-00970396>

Submitted on 1 Aug 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



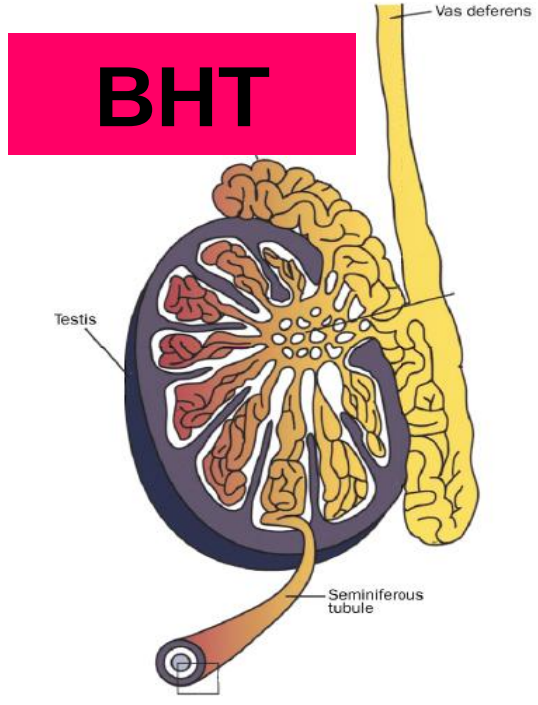
Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

LEGENDRE Audrey¹, DESMOTS S.¹, LECOMTE A.¹, ROBIDEL F.¹, DUPONT O.¹, FROMENT P.², HABERT R.³, LEMAZURIER E.¹

¹ INERIS - F 60550 Verneuil en Halatte / ² INRA - F 37380 Nouzilly/ ³ INSERM U566-CEA-Université Paris 7 - F 92265 Fontenay aux Roses

INTRODUCTION

Chez le mâle, la fonction de reproduction est assurée par le **testicule**, au niveau des **tubules séminifères**. La présence de la **barrière hémato-testiculaire (BHT)** permet de protéger la **spermatogenèse** des agressions extérieures (perturbateurs endocriniens, xénobiotiques...).



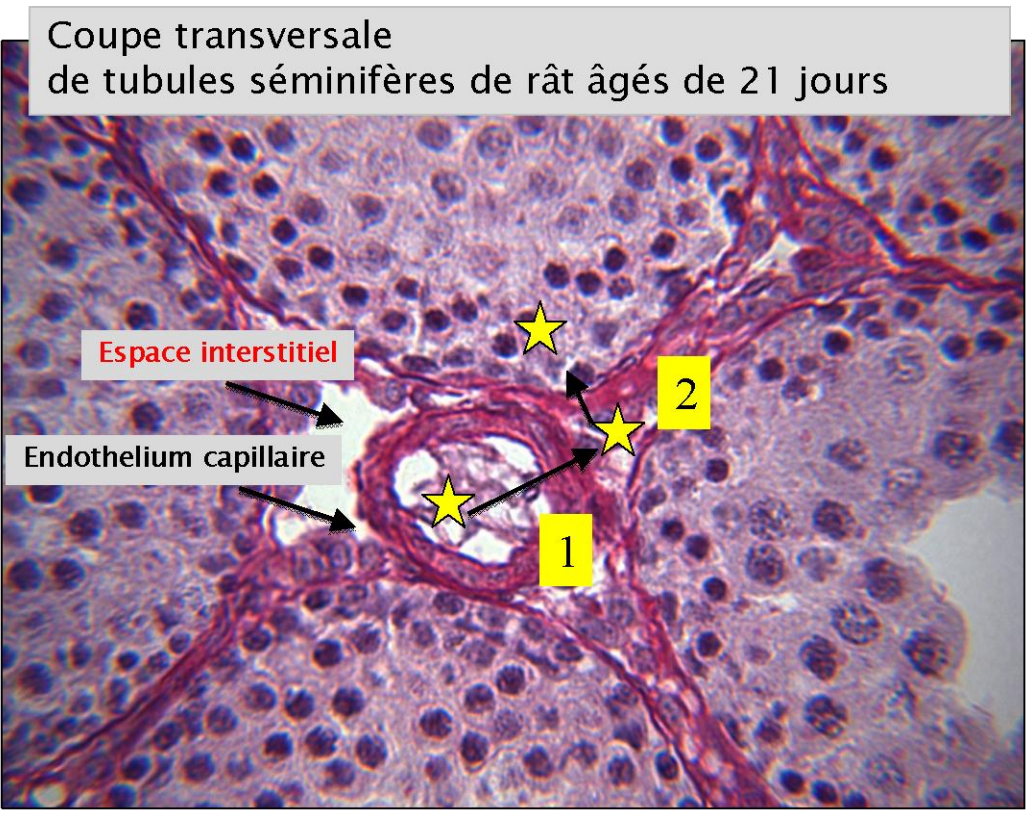
Chez le rat, la BHT se forme à la **prépuberté (J18)**.

3 rôles principaux: **barrière physico-chimique, barrière de pompes à efflux, barrière immunologique**

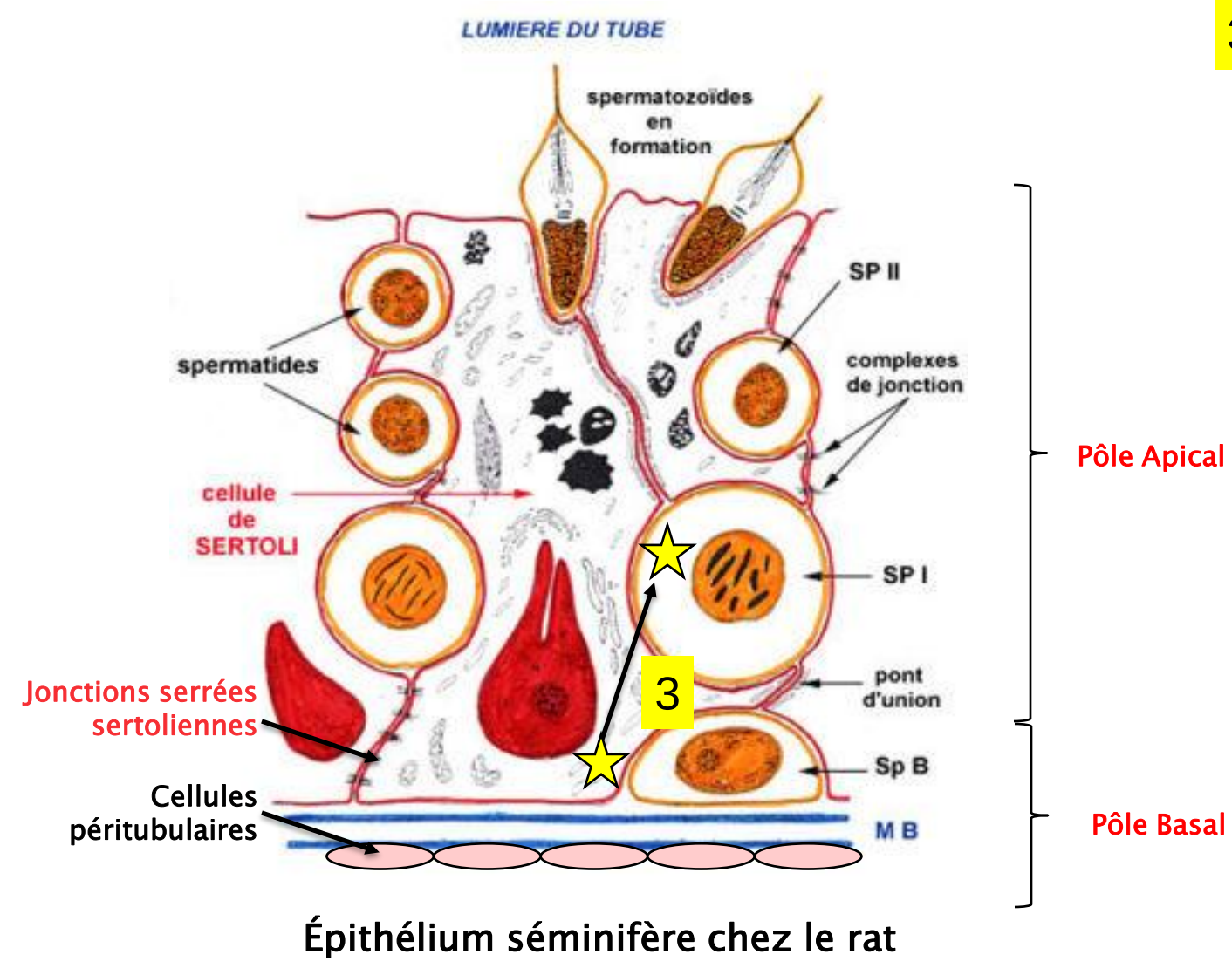
3 compartiments distincts : **interstitiel, basal et apical**

Les 3 étapes possibles successivement parcourues par un toxique échappant à la BHT *in vivo* :

1 Le *compartiment interstitiel* peut être exposé à des substances si elles traversent l'endothélium capillaire.



2 Si elles ne sont pas stoppées par les jonctions serrées présentes entre les **cellules Péritubulaires**, elles accèdent au *compartiment basal*, contenant entre autre les **cellules germinales** de type **Spermatogonies**.



3 Si les molécules parviennent à traverser les **jonctions serrées sertoliennes**, constituant la barrière d'exclusion proprement dite, les **cellules germinales méiotiques** et **post méiotiques** du *compartiment apical* sont à leurs tours exposées.

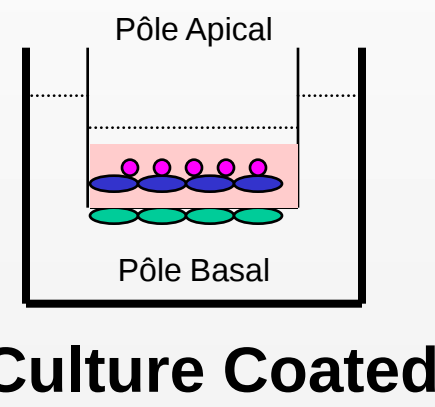
SP I ou II : Spermatocyte de type I ou II
Sp B : Spermatogonie de type B
M B : Membrane basale

Actuellement, soutenu par la nouvelle réglementation européenne **REACH**, le développement de **méthodes alternatives et complémentaires à l'expérimentation animale** est nécessaire pour l'évaluation de la reprotoxicité des substances chimiques.

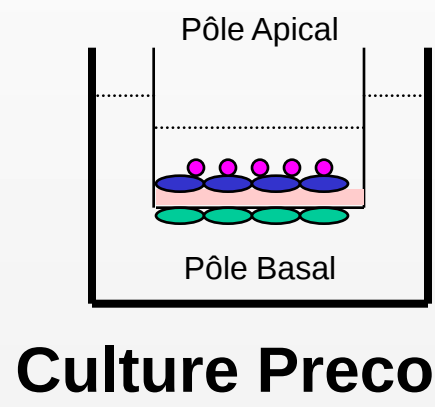
OBJECTIFS de l'ETUDE

Mise au point d'une **BHT *in vitro*** pour l'étude des effets des **perturbateurs endocriniens** en utilisant un **système original de culture primaire** composé de cellules testiculaires de rats.

Culture polarisée en chambre **bicamérale** :



OU



- Cellules germinales
- Cellules de Sertoli
- Cellules Péritubulaires
- Matrice extracellulaire (MEC) ou Membrane Basale

Organisation proche de l'épithélium séminifère chez le rat

+

Assurant les 2 grandes fonctions de la BHT :
• Fonction de **Barrière** (jonctions, P glycoprotéine...)
• Cycle complet de **Spermatogenèse** [1]

MÉTHODES

Cellules Péritubulaires

Cellules Germinales et de Sertoli



Râts mâles OFA Sprague Dawley âgés de 18 jours

Stade de spermatogenèse le plus avancé = **Spermatocyte Zygotène**

J-5 : Euthanasie + Dissociation cellulaire des testicules par digestion enzymatique

Purification par sélection et trypsination

J-1 : Ensemencement des Péritubulaires au **pôle basal**

J-3 : IP de Bromodésoxyuridine (BrdU) 30mg/kg

J0 : Euthanasie + Dissociation cellulaire des testicules par digestion enzymatique. Ensemencement des cellules **sur ou dans une MEC artificielle au pôle apical**

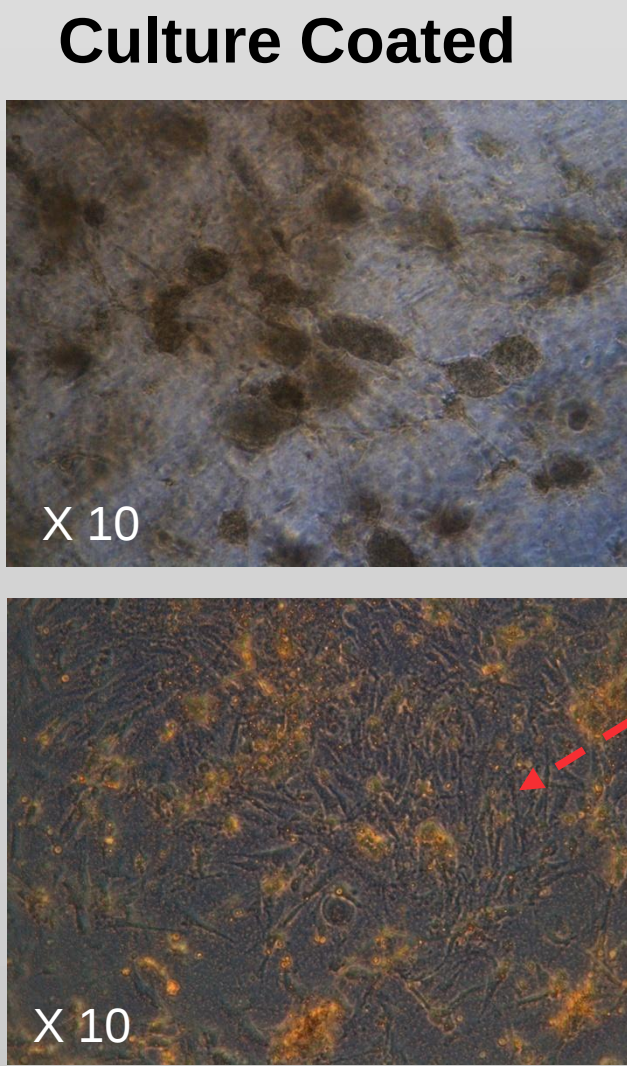
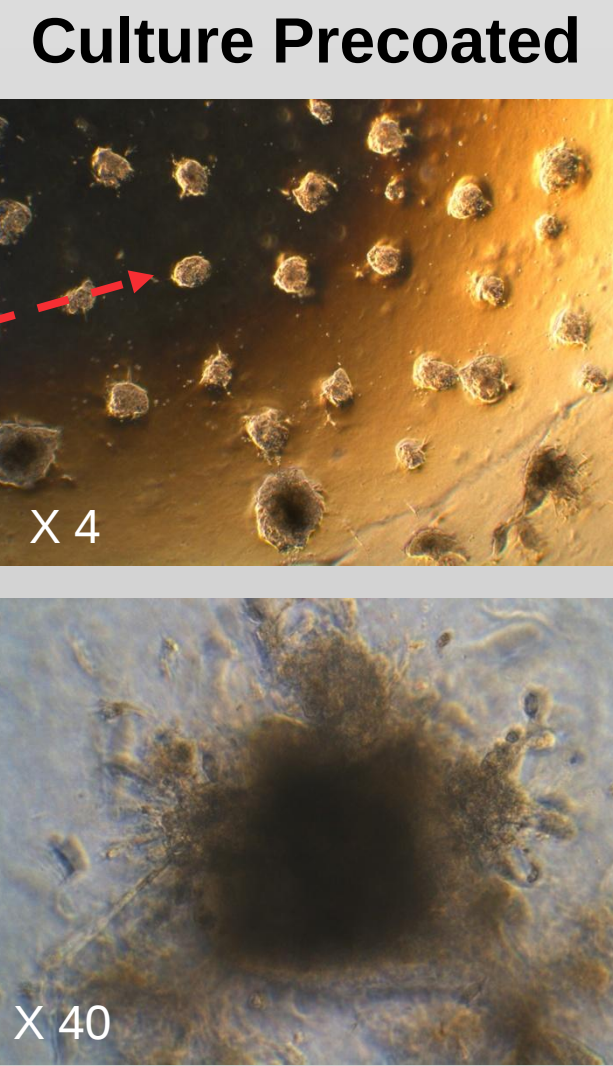
La culture est effectuée dans un milieu permettant la différenciation des *cellules germinales* (vitamines, hormones, sérum, antibiotiques) pendant 22 jours.

RÉSULTATS et DISCUSSION

I. Morphologie de la BHT *in vitro*

Organisation des **cellules germinales** et **sertoliennes** différentes selon le mode de coating

Régularité des espaces entre les agrégats laissant supposer la présence de **gradients morphogénétiques**, responsable *in vivo* du contrôle de la formation des tubules séminifères. [2]

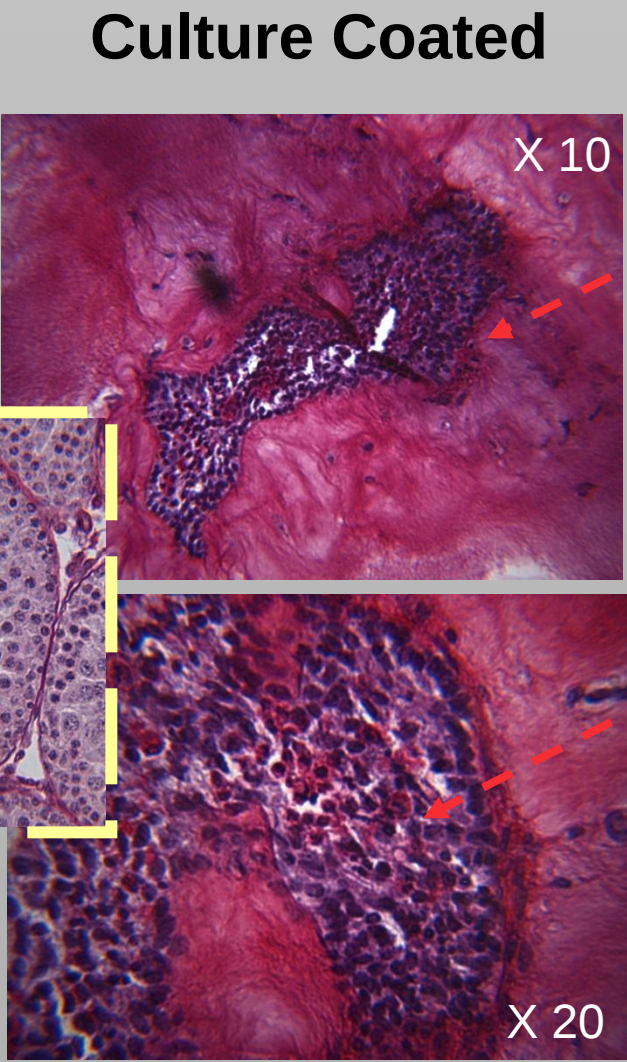
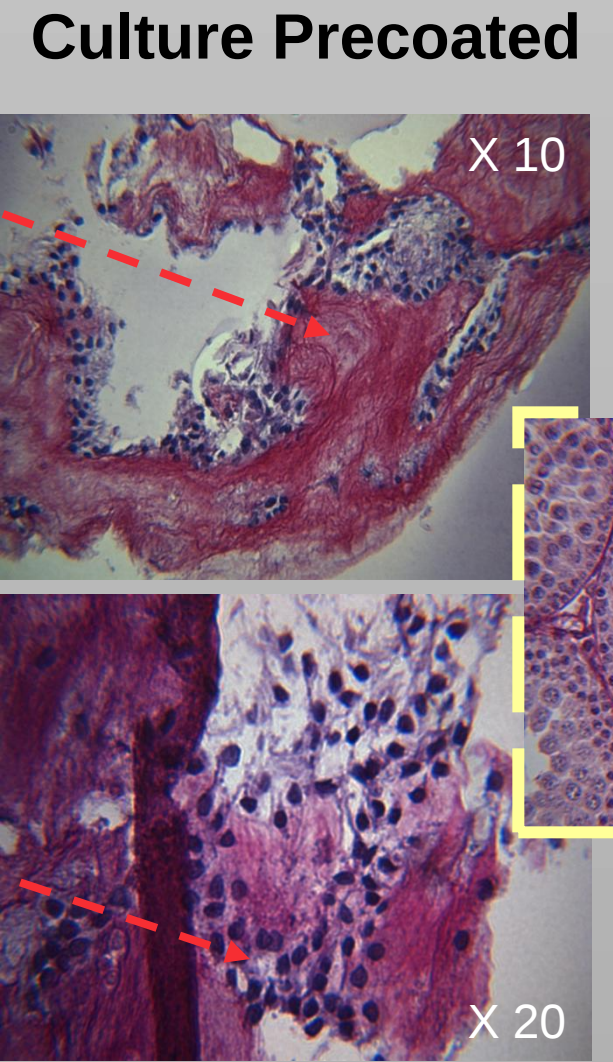


Tapis cellulaire de **cellules péritubulaires** présentes au pôle basal des deux types de culture

Agrégats ± sphériques dans ou sur la MEC

De J1 à J22 de culture

Organisation des **cellules cord-like**, proche des **tubules séminifères *in vivo***



Structure type incluse dans la MEC : présence d'une organisation épithéliale et polarisée typique des tubules séminifères

Acrosomes des **Spermatozoïdes** ou **collagène de type IV** - à déterminer par immunohistochimie

Histologie des tissus *in vitro*, Coloration au PAS-Hemalun

Validé

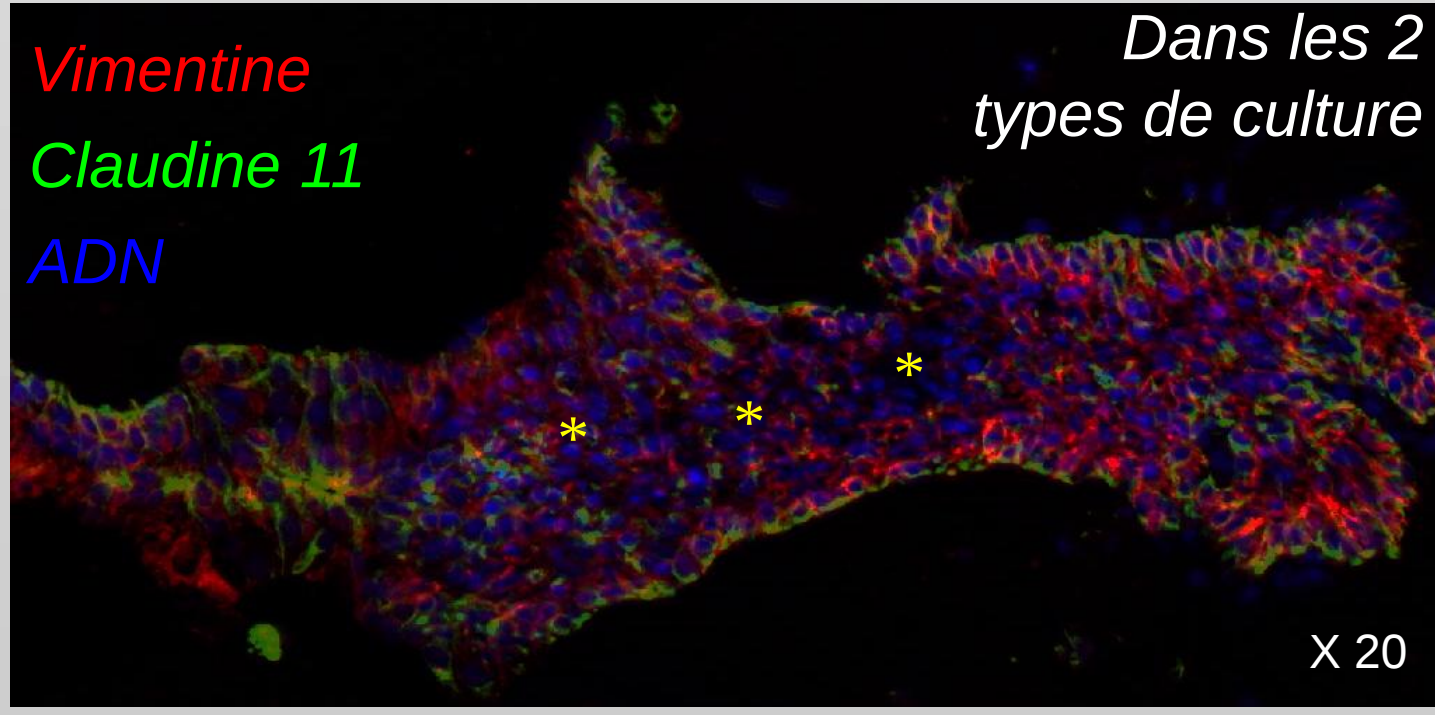
II. Fonctionnalité de la BHT *in vitro* : la barrière

Présence des **cellules de Sertoli** et des **jonctions serrées sertoliennes** caractéristiques de la BHT *in vivo* [3]

Claudine 11 : protéine membranaire spécifique des **jonctions serrées sertoliennes**

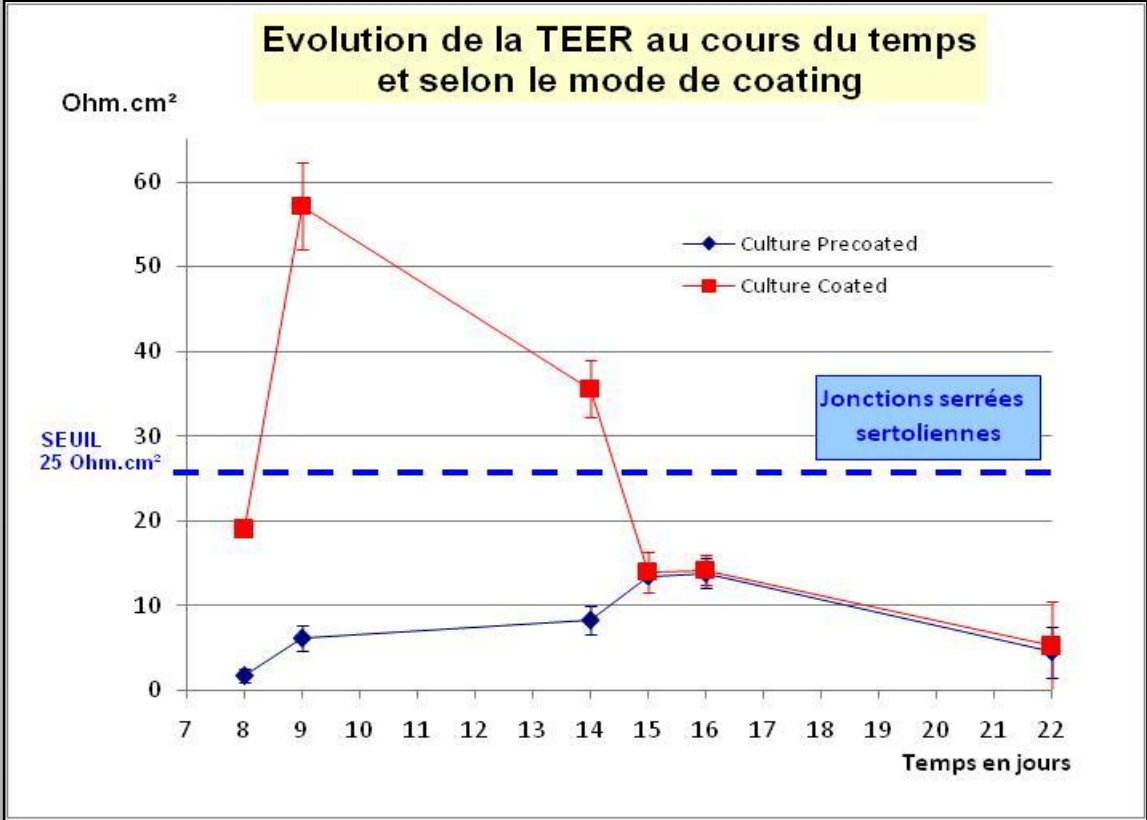
Vimentine : protéine cytoplasmique spécifique des **cellules de Sertoli**

BrdU : noyaux des cellules en phase S (**cellules somatiques**, Spg proliférantes, SP I en méiose)



Présence de cellules de **Sertoli proliférantes**, liées entre elles par des **jonctions serrées** et **délimitant les structures cord-like**. Présence de cellules non sertoliennes* (**Germinales ?**) au centre des structures.

Détection d'une résistance intra épithéliale due aux **jonctions serrées sertoliennes**



TEER : Transepithelial Electrical Resistance

La technique de mesure de la TEER met en évidence une perméabilité ionique plus faible dans les cultures Coated dépassant le seuil caractéristique de **25 Ohm.cm²** et signifiant la présence de **jonctions serrées sertoliennes** [4].

Les résultats étant différents selon le mode de coating, il sera nécessaire de vérifier la fonctionnalité des jonctions dans le maintien de la BHT pour chacun des cas.

Corrélation entre l'immunolocalisation des **jonctions serrées sertoliennes** et l'apparition d'une **résistance électrique**.
Fonctionnalité des jonctions à valider.

En cours de Validation

POURSUITE DU TRAVAIL

La fonctionnalité de la BHT reste à valider et la mise en évidence du maintien de la spermatogenèse est en cours d'analyse par **cytométrie de flux**. Cette technique permettra de **classer les cellules selon leur ploïdie** (4C, 2C, et C) et d'observer l'évolution de la répartition des différentes populations cellulaires actrices de la spermatogenèse durant la totalité de la période de culture.

Une fois mise au point, cette BHT *in vitro* permettra de **tester la toxicité potentielle de molécules à caractère perturbateur endocrinien**. Elle participera à la compréhension de leur mécanisme d'action, en particulier leur interaction avec les ABC transporteurs comme la P glycoprotéine.

Références :

- [1] Hue, D., C. Staub, et al. (1998). Meiotic differentiation of germinal cells in three-week cultures of whole cell population from rat seminiferous tubules. » *Biol. reprod.* **59**(2): 379-87.
- [2] Gassei, K., S. Schlatt, et al. (2006). « De novo morphogenesis of seminiferous tubules from dissociated immature rat testicular cells in xenografts. » *J. Androl.* **27**(4): 611-8.
- [3] Gow, A., C. M. Southwood, et al. (1999). « CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. » *Cell* **99**(6): 649-59.
- [4] Janecki, A., Jakubowiak, A., Steinberger, A. (1991). « Regulation of transepithelial electrical resistance in two-compartment sertoli cell cultures : *In vitro* model of the blood-testis barrier. » *Endocrinology* **129**: 1489-1496.