

Spermatogenèse *in vitro* : une nouvelle voie de recherche

P. DURAND¹, M. BENCHAI^{1,2}, M. GODET¹, F. GRAIN³, J.F. GUÉRIN^{1,2}, D. HUE⁴,
V. LAMBERT³, A. LEFÈVRE¹, H. LEJEUNE^{1,5}, M.H. PERRARD-SAPORI¹, P. SANCHEZ¹,
C. STAUB⁴, M. VIGIER¹, M. WEISS¹

¹ INSERM/INRA U418, Hôpital Debrousse 69322 Lyon Cedex 05 ² Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Université Claude-Bernard Lyon I, 69373 Lyon Cedex 08 ³ ENVL, Unité de Biologie de la Reproduction, BP 83, 69280 Marcy l'Etoile ⁴ INRA, Laboratoire de Physiologie de la Reproduction, 37380 Nouzilly ⁵ Clinique Endocrinologique, Hôpital de l'Antiquaille, 69321 Lyon Cedex 05.

RÉSUMÉ

Nous avons mis au point au laboratoire deux systèmes de coculture permettant à certaines étapes de la différenciation de cellules germinales mâles de rat et de souris de s'effectuer *in vitro*. Le premier système est une coculture de spermatocytes pachytènes de rats adultes et de cellules de Sertoli provenant d'animaux de 20 jours. Dans le second système de petits fragments de tubes séminifères sont ensemencés. De cette façon les jonctions intercellulaires qui sont présentes *in vivo* sont mieux maintenues *in vitro* ; de plus chaque type de cellule germinale présent dans les fragments de tubules au moment de l'ensemencement peut être étudié. Nos résultats ont montré que les deux divisions méiotiques peuvent se dérouler au cours d'une période de 2 à 4 semaines de culture. Ces résultats devraient avoir des applications dans différents domaines: recherche fondamentale, toxicologie, études cliniques et biotechnologies. Cependant, quelques améliorations et vérifications sont encore nécessaires pour établir la faisabilité et l'innocuité de ces procédures.

Mots clés: spermatogenèse *in vitro*, méiose.

I. INTRODUCTION

La spermatogenèse est un processus complexe de multiplication et de différenciation cellulaire particulière dont la régulation est imparfaitement connue [10, 20] ; elle s'opère au sein des tubes séminifères. Elle peut être divisée en trois phases distinctes : la phase proliférative, au cours de laquelle les spermatogonies, cellules diploïdes, se multiplient par mitoses ; la phase méiotique où le matériel génétique d'un spermatocyte est recombinaison et ségrégué, conduisant à la formation des spermatides, cellules haploïdes. Ces dernières vont subir au cours de la phase de spermiogenèse une différenciation conduisant à la formation des spermatozoïdes [22]. Ces étapes mettent en jeu des facteurs de régulation provenant de l'hypophyse, des cellules somatiques du testicule et des cellules germinales elles-mêmes [20, 23]. De nombreuses études ont eu pour objectif de déterminer la nature des facteurs de croissance et des cytokines présents dans le testicule, la localisation cellulaire de leur expression et de celle de leurs récepteurs [4, 16, 23]. Cependant, la démonstration directe d'un effet de telle ou telle molécule, produite localement, sur une étape particulière de la spermatogenèse a rarement été faite [7, 15, 17].

Un des objectifs de nos laboratoires a été de mettre en place deux systèmes de coculture permettant à certaines étapes de la différenciation des cellules germinales mâles de s'ef-

fectuer *in vitro* dans deux modèles expérimentaux : le rat et la souris. Chez ces espèces, en effet, les différentes étapes de la spermatogenèse ont été très bien définies [3]. De plus, la plupart des gènes dont on sait qu'ils s'expriment de façon spécifique ou séquentielle lors de la différenciation des cellules germinales mâles ont été clonés chez la souris ou le rat [5, 29].

De telles cocultures de cellules somatiques et germinales, permettant d'obtenir une spermatogenèse plus ou moins complète *in vitro*, devraient être précieuses pour étudier les régulations paracrines de la multiplication et de la différenciation des cellules germinales mâles. En outre, elles devraient aider à comprendre le mécanisme d'action des gènes contrôlant la mitose et la méiose et les phénomènes impliqués dans la répression du génome gamétique, et la mise en place de l'empreinte génomique parentale.

II. MATÉRIEL, MÉTHODES ET STRATÉGIES EXPÉRIMENTALES

Des rats Wistar ou Sprague-Dawley ont été utilisés pour ces études. Certains ont reçu une injection de 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU) afin de marquer les cellules en phase de synthèse d'ADN.

Deux méthodes de coculture cellules germinales-cellules somatiques ont été réalisées. La première, plus analytique, consiste à cultiver des spermatoocytes pachytènes de rats adultes, préparés par élutriation, sur un tapis de cellules de Sertoli de rats âgés de 20 jours. Dans la seconde méthode, plus globale, ce sont des petits fragments de tubes séminifères qui sontensemencés ; au bout de quelques jours, les cellules intratubulaires migrent et colonisent la totalité de la plaque de culture. Ainsi, on conserve beaucoup mieux *in vitro* les fonctions intercellulaires présentes *in vivo*, et la totalité des types de cellules germinales présents dans le tubule au moment de l'ensemencement peut être étudiée. Les deux types de cultures sont réalisés dans des chambres de culture de type "bicaéral", les cellules étant cultivées sur la membrane de l'insert. Seul le milieu extra-insert est renouvelé tous les deux jours.

L'étape méiotique a été caractérisée par un profil d'expression de gènes repérés au niveau de leurs ARN messagers. Les ARNm analysés sont ceux codant pour la phosphoprotéine p19 (p19) [1] et pour l'histone H2B spécifique du testicule TH2B [11], exprimés fortement par les spermatoocytes au stade pachytène, et les gènes codant pour les protéines de transition 1 et 2 (TP1 et TP2) [8, 12], qui sont fortement exprimés dans les spermatides rondes. Le déroulement de la méiose est suivi par l'évolution du rapport des produits amplifiés, par méthodes de RT-PCR, p19/TP1 et TH2B/TP2. Une coamplification des ARNm de chacun des couples est réalisée pour deux raisons essentielles :

1) Les interférences dues à l'hétérogénéité de la population cellulaire sont éliminées (proportions variables, au cours de la culture, de la quantité d'ARNm provenant des cellules germinales et des cellules somatiques) ;

2) la sensibilité du système de détection est améliorée, puisque le choix des couples de gènes se traduit, au cours de la différenciation des spermatoocytes pachytènes en spermatides, par une diminution du numérateur concomitante à une augmentation du dénominateur.

Afin de pouvoir faire la différence entre des spermatides obtenues à partir de cellules ayant juste fini leur méiose *in vitro* (spermatoocytes pachytènes de stades tardifs) et des spermatides provenant de cellules ayant effectué toute, ou une grande partie de leur différenciation *in vitro* (spermatoocytes préleptotènes ou pachytènes précoces), les cellules germinales en phase de synthèse d'ADN (spermatogonies en division et spermatoocytes I préleptotènes) sont marquées par le BrdU. Il est ainsi possible de déterminer, et même de choisir, en fonction du temps séparant l'injection de BrdU et le sacrifice des animaux, à quels stades sont les cellules marquées (BrdU+) lors de l'ensemencement, et d'évaluer ainsi, précisément, l'étape réalisée *in vitro* par les cellules marquées. Ainsi, l'étude cytologique des cultures a été réalisée par marquage immunocytochimique avec deux anticorps différents :

- un anticorps anti-BrdU

- l'anticorps MN7, qui met en évidence une pro-

téine de 90 kD spécifique de l'acrosome des spermatoïdes du stade 2 au stade 19.

Ces critères d'analyse histologique ont été complétés par des études en microscopie électronique et une étude de la ploïdie des cellules.

III. RESULTATS

Les résultats obtenus avec ces deux types de coculture montrent que le passage des deux divisions méiotiques, voire la réalisation de la quasi totalité de la méiose *in vitro*, sont réalisables au cours d'une période de culture de 2 à 4 semaines [9, 21, 25, 28] (Figures 1 et 2).

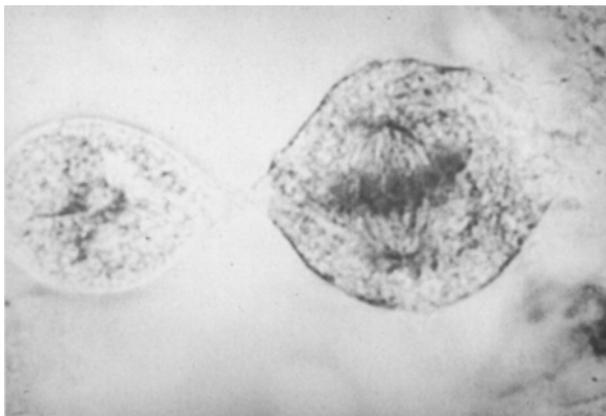


Figure 1. Un spermatozoïde secondaire relié à deux spermatozoïdes ronds subit la deuxième division de méiose au jour 10 d'une coculture de cellules de Sertoli et de spermatozoïdes pachytènes.

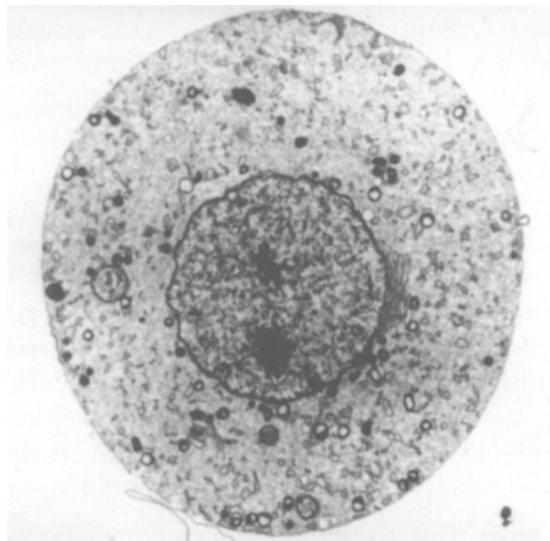


Figure 2. Une spermatozoïde ronde identifiée après 3 semaines de culture de tubes séminifères issus de rats de 20 jours.

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La mise au point de systèmes de culture permettant à certaines étapes de la spermatogénèse de s'effectuer *in vitro* devrait avoir de nombreuses applications cliniques et biotechnologiques.

Des résultats récents [2] suggèrent que les cellules germinales mâles pourraient être une alternative aux cellules ES (embryonic stem cells) dont l'existence, chez les espèces autres que la souris, reste incertaine. Chez la souris [18], le hamster [19], le lapin [24] et l'homme [27], les spermatozoïdes ronds sont déjà capables de féconder un ovocyte après injection intracytoplasmique (ICSI), conduisant à la naissance de jeunes viables après transfert dans l'utérus d'une femelle receveuse. Puisque les spermatogonies existent chez tous les mammifères, la maîtrise de leurs conditions de culture, de multiplication, de transfection et de différenciation en spermatozoïdes permettrait de réaliser des manipulations génétiques, qui jusqu'ici n'ont pu être réalisées que chez la souris ("Knock out" de gènes), chez les mammifères domestiques en particulier.

Les études de toxicologie pourraient aussi largement bénéficier de l'utilisation de systèmes *in vitro*.

En clinique humaine, la cryoconservation des spermatozoïdes avant traitement chimio-radiothérapeutique stérilisant permet de préserver des possibilités de reproduction chez l'adulte. En l'absence de spermatozoïdes matures, des mesures de préservation du potentiel de reproduction n'ont pas pu, jusqu'ici, être envisagées chez l'enfant, alors même que le taux de guérison de certaines pathologies malignes est important à cet âge.

A cette fin, cryoconserver les cellules germinales immatures obtenues chez l'enfant avant le début du traitement anti-cancéreux, comme on le fait pour les spermatozoïdes de l'homme adulte, nécessite que l'on puisse, ultérieurement, amener les cellules germinales immatures à un état de maturité compatible avec la fécondation d'un ovocyte et un développement embryonnaire normal, lorsque le sujet guéri aura un projet parental.

Une procédure comportant la maturation *in vitro* des cellules germinales mâles et leur utilisation pour fécondation assistée après cryoconservation devrait permettre d'éviter le risque lié à la réintroduction dans le testicule de cellules malignes [14].

La réalisation des étapes de la spermatogenèse *in vitro* pourrait aussi permettre le traitement de certaines stérilités liées à un déficit somatique, en cultivant les cellules germinales dans un environnement favorable à leur différenciation [26].

Toutefois, des améliorations et des vérifications sont encore nécessaires avant de pouvoir utiliser les cellules différenciées *in vitro* "en toute sérénité". Un aspect important concerne l'empreinte génomique ou parentale : celle-ci correspond à l'expression spécifique et exclusive de l'allèle maternel ou paternel de certains gènes. Elle se met en place au cours de la gamétogenèse, et un désordre de l'empreinte contribue à une variété de pathologies, certaines pouvant se manifester tardivement au cours de la vie post-natale [13]. La nature exacte de l'empreinte reste partiellement inconnue mais l'on sait qu'elle doit pouvoir être effacée puis reprogrammée au cours de la gamétogenèse, de sorte que les ovocytes portent l'empreinte maternelle et les spermatozoïdes l'empreinte paternelle. Il y a maintenant plus de 20 gènes humains identifiés soumis à empreinte et on pense qu'il pourrait y en avoir au total de 100 à 500 [6]. Les gènes soumis à empreinte sont normalement impliqués dans le développement embryonnaire. Ils peuvent également fonctionner comme des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur.

Ainsi, le développement des études dans des modèles animaux apparaît un préalable indispensable pour étudier la faisabilité de ces procédures, mais aussi pour s'assurer de leur innocuité, et ceci avant d'envisager le passage à une application clinique.

REFERENCES

1. AMAT J.A., FIELDS K.L., SCHUBART U.K. : Stage-specific expression of phosphoprotein p19 during spermatogenesis in the rat. *Mol. Reprod. Dev.*, 1990, 26 : 383-390.
2. BRINSTER R.L., ZIMMERMANN J.W. : Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1994, 91 : 11298-11302.
3. CLERMONT Y., LEBLOND C.P., MESSIER B. : Durée du cycle de l'épithélium séminal du rat. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.*, 1959, 48 : 37-56.
4. DUPAIX A., PINEAU C., PIQUET-PELLORCE C., JÉGOU B. : Paracrine and autocrine regulations of spermatogenesis. In : Hamamah S., Mieusset R. eds. *Research in Male Gametes : Production and quality*. Montrouge, Editions INSERM, 1996 : 47-63.
5. EDDY E.M. : 'Chauvinist genes' of male germ cells: gene expression during mouse spermatogenesis. *Reprod. Fert. Develop.*, 1995, 7 : 695-704.
6. FALLS J.G., PULFORD J., WYLIE A.A., JIRTLE R.L. : Genomic imprinting : implications for human disease. *Am. J. Pathol.*, 1999, 154 : 635-647.
7. HAKOVIRTA H., SYED V., JÉGOU B., PARVINEN M. : Function of Interleukin-6 as an inhibitor of meiotic DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1995, 108 : 193-198.
8. HEIDARAN M.A., KISTLER W.S. : Transcriptional and translational control of the message for transition protein 1, a major chromosomal protein of mammalian spermatids. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262 : 13309-13315.
9. HUE D., STAUB C., PERRARD-SAPORI M.H. *et al.* : Meiotic differentiation of germinal cells in three-week cultures of whole cell population from rat seminiferous tubules. *Biol. Reprod.*, 1998, 59 : 379-387.
10. KIERSZENBAUM A.L. : Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro - a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocr. Rev.*, 1994, 15 : 116-134.
11. KIM Y.J., HWANG I., TRES L.L., KIERSZENBAUM A.L., CHAE C.B. : Molecular cloning and differential expression of somatic and testis-specific H2B histone genes during rat spermatogenesis. *Dev. Biol.*, 1987, 124 : 23-34.
12. KLEENE K.C., FLYNN J.F. : Characterization of a cDNA clone encoding a basic protein, TP2, involved in chromatin condensation during spermiogenesis in the mouse. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262 : 17272-17277.
13. LATHAM K.E., MCGRATH J., SOLTER D. : Mechanistic and developmental aspects of genetic imprinting in mammals. *Int. Rev. Cytol.*, 1995, 160 : 53-98.
14. LEJEUNE H., DURAND P. : Conservation de tissu testiculaire et maturation in vitro de la lignée germinale pour préservation du potentiel de reproduction avant traitement anticancéreux chez le garçon prépubère. *Andrologie*, 1999, 9 : 498-504.
15. MATHER J.P., ATTIE K.M., WOODRUFF T.K., RICE G.C., PHILLIPS D.M. : Activin stimulates spermatogonial proliferation in germ-Sertoli cell

- cocultures from immature rat testis. *Endocrinology*, 1990, 127 : 3206-3214.
16. MAUDUIT C., BENAHMED M. : Growth factors in the testis development and function. In : Hamamah S., Mieux R. eds. *Research in Male Gametes : Production and quality*. Montrouge, Editions INSERM, 1996 : 3-45.
 17. O'DONNELL L., MCLACHLAN R.I., WREFORD N.G., DE KRETZER D.M., ROBERTSON D.M. : Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.*, 1996, 55 : 895-901.
 18. OGURA A., MATSUDA J., YANAGIMACHI R. : Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91 : 7460-7462.
 19. OGURA A., YANAGIMACHI R. : Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes form pronuclei and participate in syngamy. *Biol. Reprod.*, 1993, 48 : 219-.
 20. PARVINEN M. : Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr. Rev.*, 1982, 3 : 404-417.
 21. PERRARD-SAPORI M.H., VIGIER M., HUE D., STAUB C., WEISS M., DURAND P. : Spermatogenèse murine *in vitro* : étude cytologique de l'étape méiotique. *Contracept. Fertil. Sex.*, 1997, 25 : 556-564.
 22. RUSSELL L.D., ETTLIN R.A., SINHAHIKIM A.P., CLEGG E.D. : Mammalian spermatogenesis. In : *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater, Cache River Press, 1990 : 1-40.
 23. SKINNER M.K. : Cell-cell interactions in the testis. *Endocr. Rev.*, 1991, 12 : 45-77.
 24. SOFIKITIS N., ZAROS P., KOUTSELINIS A., MOURTZINTS D., LOUTRADIS D., GLANZOUNIS G. : Achievement of pregnancy after injection of round spermatid nuclei into rabbit oocytes and embryo transfer : a possible mode of treatment for men with spermatogenic arrest at the spermatid stage. *J. Urol.*, 1994, 5, Suppl. 151 : abstract.
 25. STAUB C., HUE D., NICOLLE J.C., PERRARD-SAPORI M.H., SEGRETAINE D., DURAND P. : The whole meiotic process can occur *in vitro* in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp. Cell. Res.* 2000: (sous presse)
 26. TESARIK J., BAHCECI M., OZCAN C., GRECO E., MENDOZA C. : Restoration of fertility by *in vitro* spermatogenesis. *Lancet*, 1999, 353 : 555-556.
 27. TESARIK J., MENDOZA C., TESTART J. : Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N. Engl. J. Med.*, 1995, : 333-525.
 28. WEISS M., VIGIER M., HUE D. *et al.* : Pre- and post-meiotic expression of male germ cell-specific genes throughout 2-week cocultures of rat germinal and Sertoli cells. *Biol. Reprod.*, 1997, 57 : 68-76.
 29. WOLGEMUTH D.J., WATRIN F. : List of cloned mouse genes with unique expression patterns during spermatogenesis. *Mammalian Genome*, 1991, 1 : 283-288.

ABSTRACT

In vitro spermatogenesis : a new way of investigations

P. DURAND, M. BENCHAIIB, M. GODET, F. GRAIN, J.F. GUÉRIN, D. HUE, V. LAMBERT, A. LEFÈVRE, H. LEJEUNE, M.H. PERRARD-SAPORI, P. SANCHEZ, C. STAUB, M. VIGIER, M. WEISS

Studies in our laboratory have aimed to settle two culture systems allowing some steps of rodent spermatogenic cell differentiation to occur *in vitro*. The first system is a coculture of pachytene spermatocytes from adult rats together with Sertoli cells from 20-day-old animals. In the second system, small pieces of spermatogenic tubules are seeded. In that way the cell-cell junctions which are present *in vivo* are better maintained *in vitro* ; *in addition* every type of germ cell present in the tubule segments at the time of seeding can be studied. Our results have shown that the two meiotic divisions or even most of the meiotic process can occur over a 2 to 4 week-culture period. These results should have applications in basic research, toxicology, clinical studies and biotechnology. However, for these latter, some improvements and verifications are still needed in order to assess the feasibility and the innocuity of these procedures.

Key words : *Spermatogenesis, In vitro, Meiosis.*