

Les nouveaux enjeux de la toxicologie testiculaire

New developments in testicular toxicology

P. Durand

© SALF et Springer-Verlag France 2010

Des études épidémiologiques suggèrent que l'exposition à des polluants présents dans l'environnement serait, en partie, responsable d'altérations de la fonction de reproduction masculine et de certaines pathologies testiculaires (diminution du nombre de spermatozoïdes, cryptorchidie, hypospadias et cancers) dont le nombre a augmenté au cours des cinq dernières décennies dans les pays industrialisés [1]. Des recherches ont été menées pour déterminer les effets délétères possibles d'une grande variété de produits chimiques sur la fertilité masculine. Ces études ont souligné la nécessité de clarifier les mécanismes d'action des différentes classes de produits au niveau des tissus impliqués. Toutefois, l'exploration de ces mécanismes *in vivo* peut être difficile dans un environnement où les hormones endogènes coexistent avec les composés chimiques et/ou pharmaceutiques étudiés. De plus, la toxicologie classique sur animaux éclaire plus sur la toxicité aiguë, à forte dose, que sur les effets chroniques de faibles quantités de toxiques, et les modifications cellulaires intimes qui en résultent. C'est pourquoi, selon Hartung, « les méthodes pour tester les effets néfastes des substances, sur l'Homme et sur l'environnement, nécessitent une refonte radicale, si nous voulons relever les défis d'assurer la santé et la sécurité » [2].

Depuis le 1^{er} juin 2007, la mise en place de la réglementation REACH (règlement sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques) à l'échelle de l'Europe impose d'étudier les risques liés aux substances chimiques et aux matériaux. Plus de 30 000 substances chimiques sont concernées par cette procédure qui est gérée par l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA). En particulier, les substances mutagènes ou toxiques pour la reproduction sont soumises à une procédure d'autorisation spéciale. Pour les molécules

concernées par REACH, il est nécessaire d'effectuer une batterie de tests physicochimiques, d'écotoxicité et de toxicité. L'expérimentation animale nécessaire à ces tests pourrait entraîner l'utilisation de plusieurs millions d'animaux. Parallèlement, il y a une forte demande sociétale pour réduire le nombre d'animaux sacrifiés et appliquer la règle des « 3R » (*reduce, refine, replace*). Or, pour Hartung et Rovida [3], les tests de toxicité pour la reproduction représentent à eux seuls « 90 % des animaux et 70 % des coûts de REACH ».

De plus en plus, les études de toxicologie font appel à la toxicogénomique sur des lignées de cellules en culture pour identifier les gènes dont l'expression est modifiée par les toxiques. Cependant, cette approche n'est pas réalisable en toxicologie testiculaire, car il n'y a pas de lignée de cellules germinales qui permette de répondre à cette demande, puisque la différenciation des cellules germinales est dépendante d'interactions avec les cellules somatiques du testicule. De surcroît, les molécules chimiques peuvent agir à différents moments de la vie d'un individu, et notamment durant la vie fœtale qui est une des périodes critiques pour la mise en place de la fertilité masculine. C'est pourquoi, des systèmes de culture organotypique de fragments de testicules fœtaux humains ou de rongeurs ont été récemment développés [4,5]. Les tissus, ainsi cultivés, gardent pendant quelques jours leur organisation tridimensionnelle et leur fonction. Couplés à des études morphologiques, fonctionnelles et moléculaires, ces systèmes permettent d'analyser, sur une durée de trois à cinq jours, les effets de substances sur le développement précoce du testicule et leur impact sur les gonocytes. Ces systèmes, cependant, ne répondent qu'à de fortes concentrations de toxiques. En outre, ils ne renseignent pas sur les effets éventuels des molécules lors d'expositions plus tardives, sur les différents types de cellules germinales qui se mettent en place au cours des phases de développement néonatal (spermatogonies), prépubertaire (spermatocytes) et (post)-pubertaire (spermatides et spermatozoïdes), ni sur les relations entre cellules testiculaires différenciées. Par ailleurs, la disponibilité du tissu humain peut limiter une utilisation à grande échelle de cette approche.

P. Durand (✉)
Institut de génomique fonctionnelle de Lyon,
UMR 5242 CNRS-INRA École normale supérieure de Lyon,
université de Lyon-I, 46, allée d'Italie, F-69364 Lyon cedex 07,
France
e-mail : philippe.durand@ens-lyon.fr

Depuis plus de 12 ans, notre équipe a développé des systèmes de coculture des cellules germinales de rats mâles avec des cellules de Sertoli, dans un milieu de culture sans sérum, permettant d'étudier *ex vivo* différentes étapes de la spermatogenèse (la phase mitotique, la totalité de l'étape méiotique ainsi que le début de la spermiogenèse) sur une durée allant jusqu'à quatre semaines [6–8]. En effet, ces cocultures, réalisées en chambres de culture bicamérales, permettent la (re-)formation et/ou le maintien de la barrière hémotesticulaire, qui est essentielle au bon déroulement de la spermatogenèse. La fonctionnalité de la barrière hémotesticulaire *ex vivo* est attestée par plusieurs critères :

- l'organisation tridimensionnelle des cellules présente, au cours de la culture, une distribution complexe, polarisée, très proche de l'organisation tubulaire dans le testicule [9] ;
- la présence des protéines de jonctions de type *tight* ou *gap* entre cellules de Sertoli et *gap* entre cellules de Sertoli et cellules germinales est observée tout au long de la culture, et on peut mettre en évidence leur implication dans les processus de prolifération, de différenciation et de survie de ces cellules [10,11] ;
- la transferrine, sécrétée par les cellules de Sertoli, s'accumule dans le compartiment apical de la chambre bicamérale (dont on ne renouvelle jamais le milieu pendant toute la culture), pour devenir six à huit fois plus concentrée que dans le compartiment basal (dont le milieu est renouvelé tous les deux jours) ; cela indique une « ségrégation » entre les deux compartiments de la chambre de culture [9].

Ces systèmes de coculture originaux permettent ainsi d'étudier :

- la physiologie de la barrière hémotesticulaire ;
- la survie et la mort des cellules somatiques et germinales ;
- la prolifération des cellules de Sertoli et des spermatogonies ;
- les divisions méiotiques ;
- les caractéristiques cytogénétiques des cellules germinales ;
- les premiers stades de la spermiogenèse ;
- le rôle de la matrice extracellulaire ;
- l'expression de gènes spécifiques dans les cellules germinales ou somatiques (transcriptome) ;
- le profil d'expression et de sécrétion des protéines et des peptides exprimés par les différentes cellules (protéome).

Deux aspects importants des résultats obtenus en utilisant des modèles *ex vivo* sont leur pertinence par rapport à la situation *in vivo* (physiologique) et leur reproductibilité. Les systèmes de coculture, que nous avons établis, répondent à ces exigences ; ils ont été validés du point de vue physiologique, sur de nombreux aspects, au cours des 12 dernières années [11]. Ils permettent, en conséquence, d'étudier les processus physiologiques impliqués dans la

spermatogenèse. Ils sont aussi pertinents pour rechercher les mécanismes des effets toxiques de substances chimiques sur le testicule. Soulignons qu'il est ainsi possible d'étudier les effets d'une substance ajoutée dans le compartiment basal de la chambre bicamérale, et donc de mimer ce qui pourrait se produire dans le testicule. En effet, les jonctions cellulaires, entre les cellules de Sertoli et entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales, sont maintenues ou reformées dans ces cultures. Par conséquent, avant d'atteindre les cellules germinales, les composés doivent traverser la barrière constituée par les jonctions intersertoliennes, composante principale de la barrière hémotesticulaire. En revanche, en culture classique, un composé peut être toxique pour les cellules germinales différenciées, car placé directement en contact avec celles-ci, tandis que *in vivo* il peut ne pas avoir accès au compartiment des tubes séminifères où résident ces cellules germinales. Dans une étude récente [12], des cocultures ont été réalisées pendant 16 jours, en présence ou en absence de 1, 10 ou 100 microgrammes par litre de chrome (VI), correspondant à des concentrations que l'on peut trouver dans le sérum d'hommes sains, non exposés ou de travailleurs exposés au chrome ; cela dans une démarche que nous pourrions qualifier de *physiotoxicologie testiculaire*. Les résultats ont montré que :

- le nombre d'anomalies cytogénétiques des cellules germinales augmente avec la concentration de chrome (VI) [multiplication par 2, 3 ou 4 à 1, 10 et 100 microgrammes par litre, respectivement, par rapport à la condition sans chrome] ;
- le chrome (VI) diminue, même à faible concentration, le nombre de spermatozoïdes formés au cours de la culture.

Ces résultats démontrent que ce type d'approche permet d'effectuer une analyse fine, nécessaire pour appréhender le mécanisme de l'effet d'un produit toxique sur la spermatogenèse.

Nous assistons depuis plusieurs années à un accroissement de la diversité des molécules présentes dans notre environnement, lesquelles peuvent entraîner des effets délétères sur l'organisme, même à des doses très faibles (micropolluants). Aussi devient-il indispensable de mieux connaître leur impact sur la santé humaine et sur l'environnement. Les systèmes de coculture développés dans notre laboratoire, couplés à des méthodes analytiques performantes, sont un outil pertinent pour étudier la physiologie de la spermatogenèse ; à notre connaissance, il n'y a pas d'autre système qui ait été aussi largement validé. Ils permettent également de rechercher, notamment dans le cadre de REACH, l'effet toxique potentiel sur le testicule, des substances utilisées dans la vie courante, sur une période de temps relativement longue, tout en réduisant de 10 à 20 fois le nombre d'animaux requis pour ces études.

Remerciements L'auteur remercie Marie-Hélène Perrard (IGFL/ENS Lyon) et Georges Pointis (Inserm U895, université de Nice Sophia-Antipolis, F-06204 Nice cedex 03) pour leur relecture critique du manuscrit.

Conflit d'intérêt : aucun.

Références

- Olesen IA, Sonne SB, Hoei-Hansen CE, et al (2007) Environment, testicular dysgenesis and carcinoma in situ testis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21:462–78
- Hartung T (2009) Toxicology for the twenty first century. *Nature* 460:208–12
- Hartung T, Rovida C (2009) Chemical regulators have overreached. *Nature* 460:1080–1
- Lambrot R, Muczynski V, Lécureuil C, et al (2009) Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. *Environ Health Perspect* 117:32–7
- Chauvigné F, Menuet A, Lesné L, et al (2009) Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis in vitro. *Environ Health Perspect* 117:515–21
- Weiss M, Vigier M, Hue D, et al (1997) Pre- and postmeiotic expression of male germ cell-specific genes throughout 2-week cocultures of rat germinal and Sertoli cells. *Biol Reprod* 57: 68–76
- Hue D, Staub C, Perrard-Sapori MH, et al (1998) Meiotic differentiation of germinal cells in three-week cultures of whole cell population from rat seminiferous tubules. *Biol Reprod* 59:379–87
- Marret C, Durand P (2000) Culture of porcine spermatogonia: effects of purification of the germ cells, extracellular matrix and fetal calf serum on their survival and multiplication. *Reprod Nutr Dev* 40:305–19
- Staub C, Hue D, Nicolle JC, et al (2000) The whole meiotic process can occur in vitro in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp Cell Res* 260:85–95
- Gilleron J, Carette D, Durand P, et al (2009) Connexin 43 a potential regulator of cell proliferation and apoptosis within the seminiferous epithelium. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1381–90
- Perrard MH, Grenet C, Prisant N, et al (2010) Analyse de la spermatogenèse ex vivo. Application à la toxicologie testiculaire. *Med Sci (Paris)* 26:305–10
- Geoffroy-Siraudin C, Perrard MH, Chaspoul F, et al (2010) Validation of a rat seminiferous tubule culture model as a suitable system for studying toxicant impact on meiosis effect of hexavalent chromium. *Toxicol Sci* (in press)



springer.com

Sign up for SpringerAlerts

The best way to keep you up-to-date with new developments in your field!

You can customize your SpringerAlerts to deliver exactly the information you need!

We offer

- ▶ Table of Contents Alerts for Journals
- ▶ Table of Contents Alerts for Book Series
- ▶ New Book Alert

As an alerts subscriber, you will receive

- ▶ Reliable news about journals and upcoming books
- ▶ Special offers – be the first to know about free online access to journals and discounts on books

springer.com/alerts – fast, free and flexible

