



Un modèle de barrière hémato-testiculaire in vitro pour l'évaluation de la reprotoxicité chez le mâle

A. Legendre, S. Desmots, A. Lecomte, Pascal Froment, René Habert,
Emmanuel Lemazurier

► To cite this version:

A. Legendre, S. Desmots, A. Lecomte, Pascal Froment, René Habert, et al.. Un modèle de barrière hémato-testiculaire in vitro pour l'évaluation de la reprotoxicité chez le mâle. Congrès de la Société de Pharmacotoxicologie Cellulaire (SPTC) "Toxicologie prédictive, les voies du futur", May 2010, Paris, France. 1 p. hal-02821807

HAL Id: hal-02821807

<https://hal.inrae.fr/hal-02821807>

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

Un modèle de barrière hémato-testiculaire in vitro pour l'évaluation de la reprotoxicité chez le mâle

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

¹ Laboratoire de Toxicologie Expérimentale - INERIS - Verneuil en Halatte - France, ² INRA - Nouzilly – France,

³ INSERM U967-CEA-Université Paris 7 - Fontenay aux Roses – France.

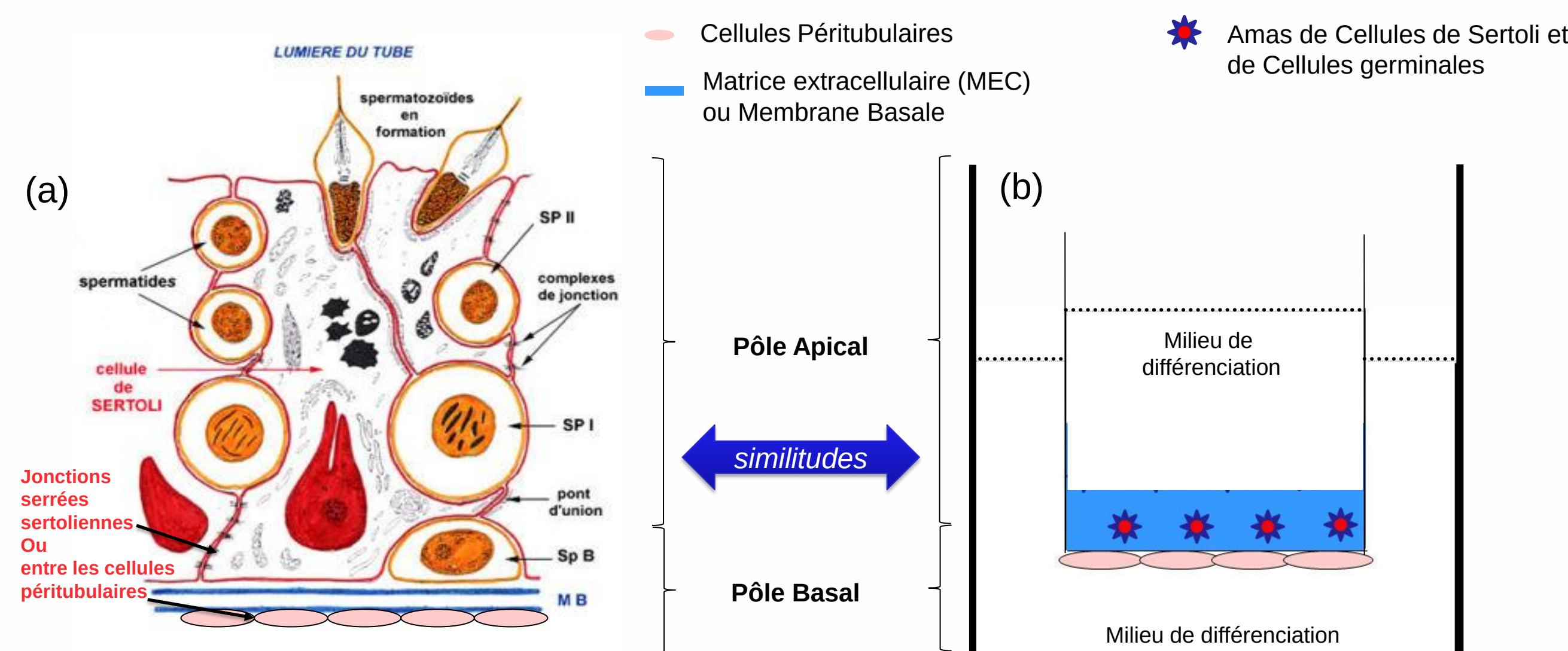
OBJECTIF

Dans le contexte de la réglementation **REACH** et de l'**accroissement des altérations des fonctions reproductrices masculines**, le développement de nouvelles **méthodes alternatives** à l'expérimentation animale représente une priorité pour les **études de reprotoxicité**. Chez le mâle, la **barrière hémato-testiculaire (BHT)** constitue un système complexe de **défense du testicule face aux agressions extérieures**.

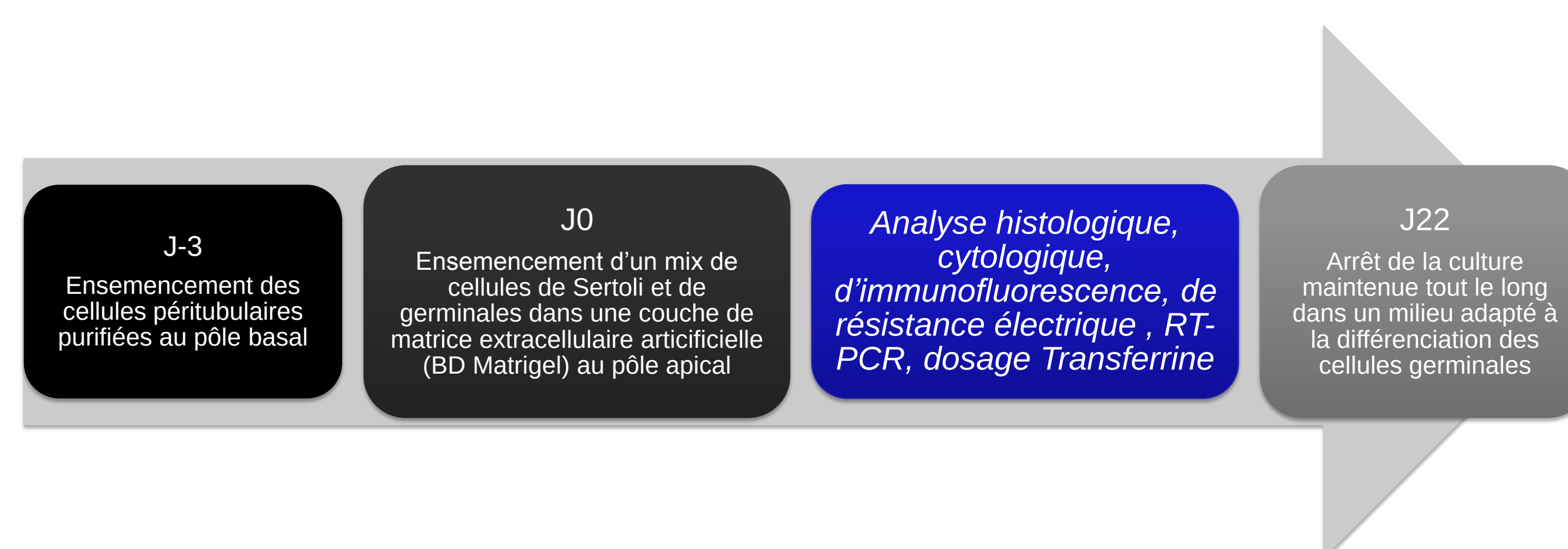
L'objectif de notre travail est de **développer un modèle *in vitro*** de la BHT reproduisant le plus fidèlement possible la composition, l'organisation et la fonction principale de la BHT de rat : **les fonctions de barrière et de spermatogenèse**. Ce modèle permettra ainsi de **prédire les effets toxiques** de certaines molécules chimiques sur la fonction de reproduction mâle.

METHODOLOGIE

Mise en place d'un système original de culture 3D en chambre bicamérale à partir de cellules primaires issues de rats Sprague-Dawley âgés de 18 jours (*cycle de spermatogenèse inachevée, stade le plus avancé – zygotène*).



Organisation schématisque des cellules testiculaires (pérutubulaires, Sertoli et germinales) : l'épithélium séminifère *in vivo* de rat (a) et la Barrière Hémato-Testiculaire reconstituée *in vitro* dans notre modèle de culture (b).



Chronologie et détails des étapes de la mise en place et de l'analyse de la culture BHT.

RESULTATS

Morphologie

Après environ 2 jours de culture, le tissu obtenu présente des **amas sphériques** soumis à des gradients morphogénétiques (Figure 1). Leur organisation est proche du tubule séminifère (TS) *in vivo* : **diamètre** des structures équivalents ($\pm 158\mu\text{m}$) (Figure 2), **polarisation des cellules de Sertoli (SC)** (Figure 3-4).

Chaque type testiculaire, présent initialement dans le modèle *in vitro*, a été identifié par immunodétection et RT-PCR (cellules de **Sertoli**, cellules **pérutubulaires**, cellules germinales (GC) - **spermatogonies**, **spermatocytes de type leptotènes** et **zygotènes** -).

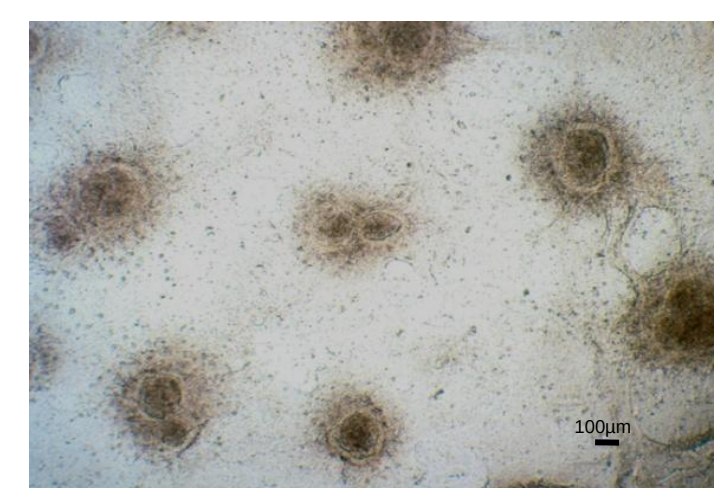


Fig 1: Régularité entre les espaces

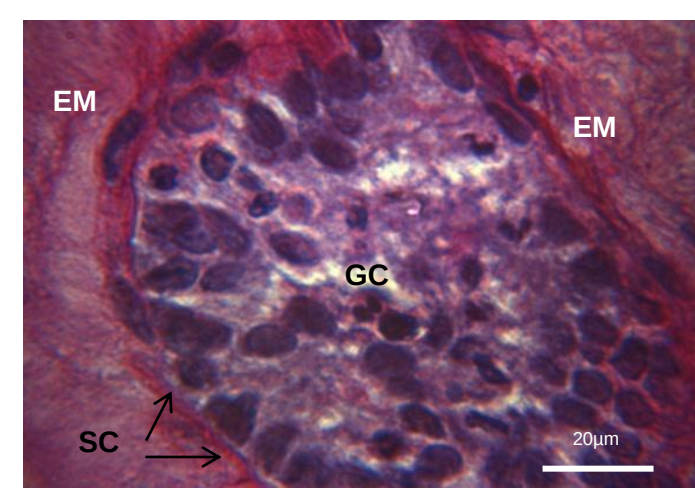


Fig 3 : Organisation proche des TS *in vivo*

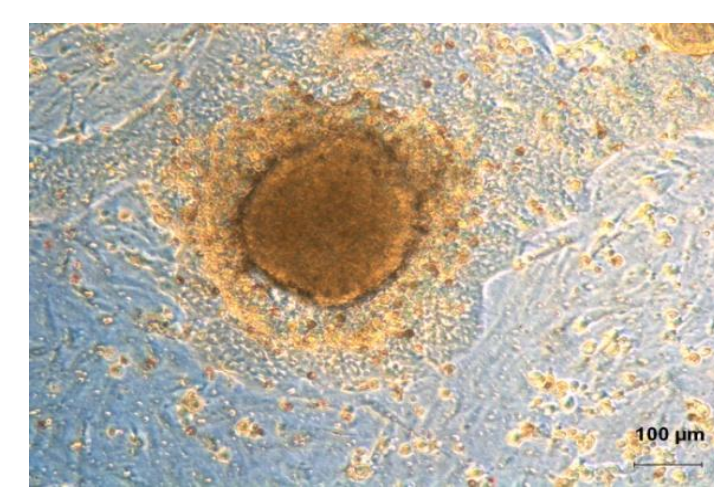


Fig 2: Structure sphérique

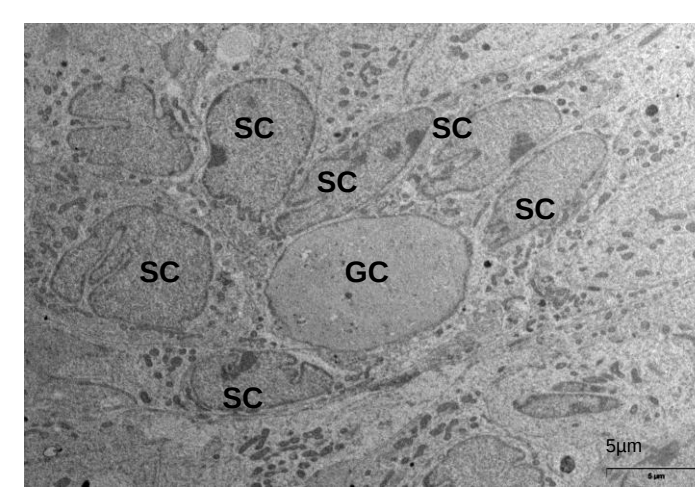


Fig 4: Polarisation des SC, Présence des GC et de la MEC

1. Une barrière physico-chimique

La présence de **jonctions serrées**, capable de bloquer le passage des molécules *in vivo*, a été mis en évidence entre les **SC** par détection de la **claudine 11** (Figure 5). Leur fonctionnalité a été étudiée par mesure de résistances électriques (TEER). Lorsque les cellules **pérutubulaires (PC)** sont présentes dans le modèle *in vitro* (**eBHT**), elles forment des jonctions serrées fonctionnelles entre le 6 et 17^{ème} jours de la culture.

Jonctions serrées fonctionnelles: TEER > 25 Ohm.cm²

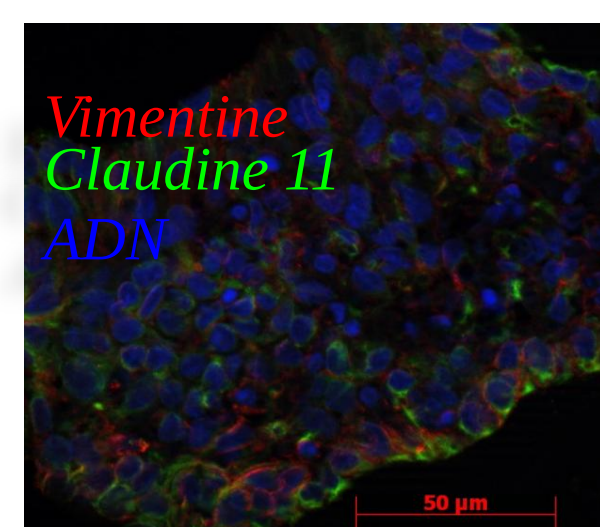
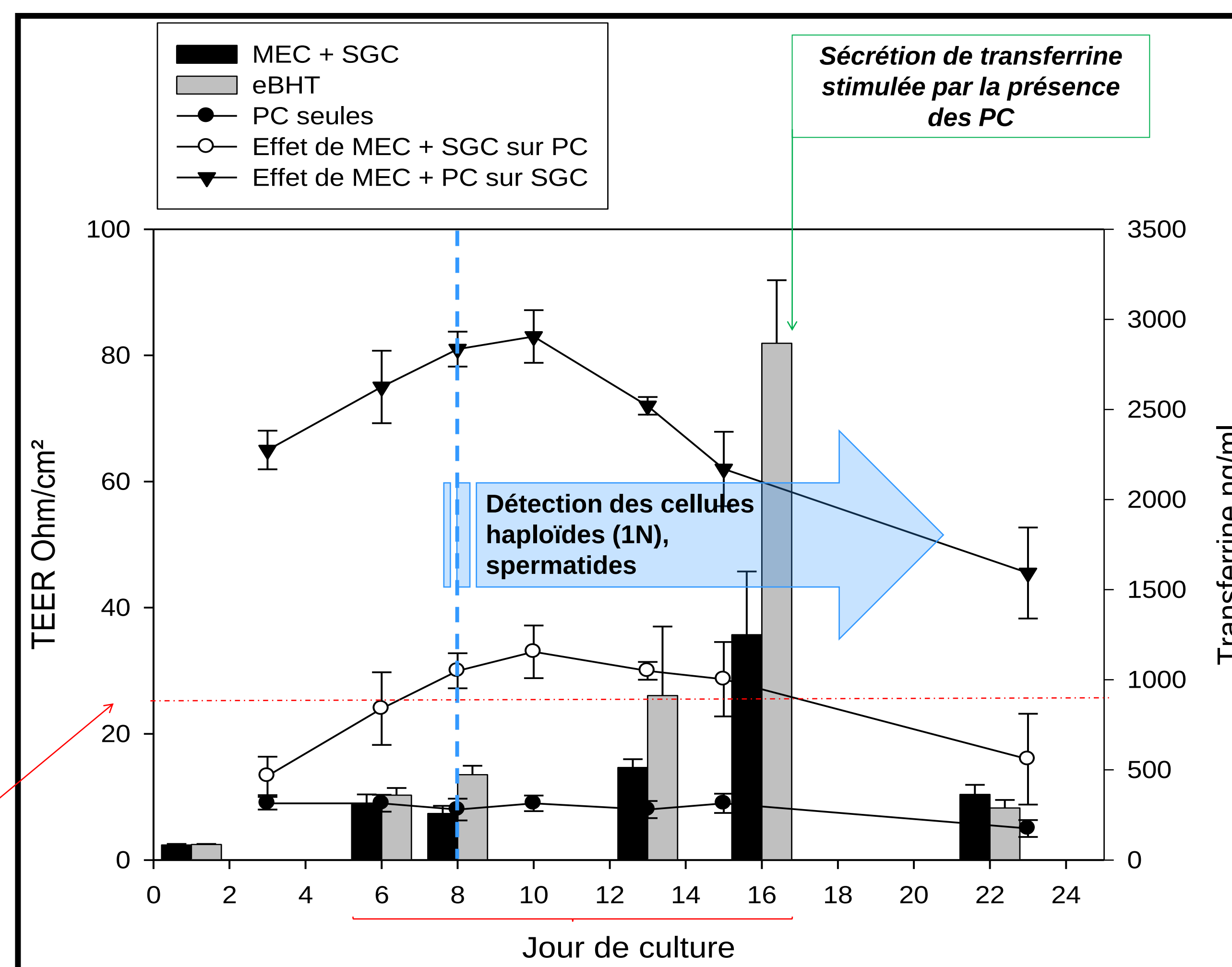


Figure 5 : Détection par immunofluorescence de la claudine 11, protéine spécifique des jonctions serrées entre les SC, identifiée par la présence de Vimentine.

Fonctionnalités



3. La différenciation in vitro des cellules germinales

Dès le 8^{ème} jour de culture, la détection de cellules germinales de type **haploïdes**, stade postérieur aux cellules zygotènes, démontre la différenciation des cellules germinales, confirmant la présence d'une **spermatogenèse in vitro**.

2. Sécrétion de transferrine

La transferrine est une protéine synthétisée par la **SC** et capable de stimuler la **différenciation des CG**. Détectée au **pôle apical** des cultures de eBHT, cette sécrétion est **stimulée par la présence des PC** et atteint un **maximum** autour du **16^{ème} jours** de culture.

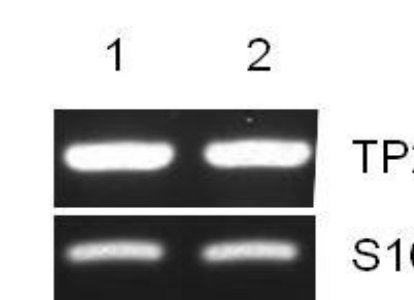


Figure 9: expression de l'ARNm TP2/16S dans le modèle de eBHT *in vitro* à 8 jours de culture (1) et chez le rat adulte (2)

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Le modèle de BHT *in vitro* présente de nombreuses similitudes avec l'épithélium séminifère *in vivo*. Il se place ainsi comme un **système in vitro de choix pour l'étude de la reprotoxicité de certains composés chimiques**.

De cette façon, des études ont été amorcées afin de valider et valoriser le modèle. En effet, des expositions *in vitro* ont été réalisées pour évaluer l'effet de perturbateurs endocriniens de référence (Diéthylstilbestrol, Méthoxychlore et Vinclozoline) sur les fonctions physiologiques (barrière physico-chimique, spermatogenèse...) de la BHT *in vitro*.

Communication

Legendre A, Froment P, Desmots S, Lecomte A, Habert R, Lemazurier E. An engineered 3D blood-testis barrier model for the assessment of reproductive toxicity potential. Biomaterials 2010;31:4492-4505

Collaborations

Pascal Froment - INRA Tours – Nouzilly
Florian Guillou – INRA Tours - NOUZILLY
Patrice Delalain, Moirez Karine – INERIS

Références

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Janecki, A., Jakubowski, 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.
- [4] Zamudio, N., S. Chong, et al. (2008). « Epigenetic Regulation in Male Germ Cells. » *Reproduction*.
- [5] Oko R.J., Jando V. et al (1996). « Chromatin Reorganization in Rat Spermatozoa during the Disappearance of Testis-Specific Histone, H1t, and the Appearance of Transition Proteins TP1 and TP2. » *Biol reprod* **54**(5): 1141-1157.
- [6] 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.