

# Méthode d'évaluation *in vitro* de la toxicité potentielle de différentes eaux sur la spermatogenèse

Guillaume Martin<sup>1</sup>, Antonine Blondet<sup>1</sup>, Emilie Christin<sup>1</sup>, Marie-Hélène Perrard<sup>2</sup>, Philippe Durand<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kallistem, ENS Lyon, France ; <sup>2</sup> INSERM U 846, Lyon, France

## INTRODUCTION

La **baïsse de la fertilité masculine** est un fait avéré : le nombre de spermatozoïdes par éjaculat a diminué de 50% au cours des 50 dernières années <sup>ref 1</sup>.

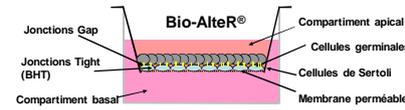
L'**eau potable peut contenir de nombreuses molécules toxiques** (pesticides, métaux lourds, résidus médicamenteux) <sup>ref 2</sup>. Certains de ces composés sont notamment des perturbateurs endocriniens. De plus, les effets de ces molécules peuvent se potentialiser (effet **cocktail**) <sup>ref 3</sup>.

**Kallistem** a donc développé une méthode de type « Bio-assay » permettant d'évaluer *in vitro* la toxicité potentielle de molécules sur la spermatogenèse.

Dans cette étude, nous comparons l'**effet de différentes eaux sur la spermatogenèse**. Nous choisissons donc ici de déterminer l'effet physio-toxicologique **global** de l'eau plutôt que celui d'une molécule isolée.

## MATERIEL ET METHODES

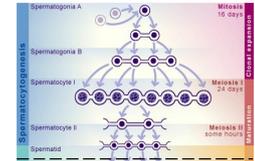
1. Les **tubes séminifères de rats** Sprague Dawley juvéniles (22 jours) sont mis en culture dans le système Bio-Alter <sup>ref 4,7</sup>.



2. Les **différentes eaux testées** sont ensuite mises en contact avec les cellules à une concentration finale de 80% (v/v) :

- ~ Eau Contrôle : Eau Versol
- ~ Eau 1 : Eau du robinet A
- ~ Eau 2 : Eau du robinet B
- ~ Eau 3 : Eau en bouteille plastique A
- ~ Eau 4 : Eau en bouteille plastique B

3. Les cellules primaires sont **cultivées pendant 20 jours** (réalisation de 80% de la spermatogenèse *in vitro*) en présence des différentes eaux testées.

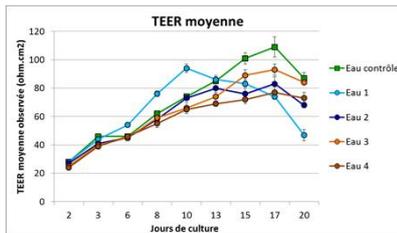


Etapes réalisées *in vitro* dans le système Bio-Alter

4. Afin de déterminer l'impact de différentes eaux, nous avons réalisé les analyses suivantes :

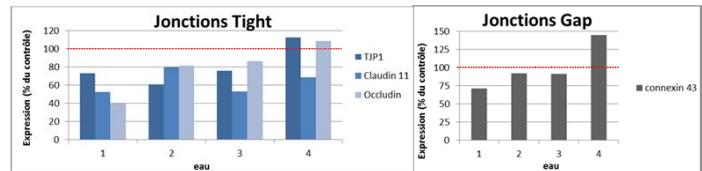
- ~ Evaluation de l'intégrité de la barrière hémato-testiculaire tout au long de la culture par mesure de la **TEER** (Trans Epithelial Electric Resistance),
- ~ Mesure à J20 de l'expression de différents gènes caractéristiques de la spermatogenèse (par **RT-qPCR**).

## Barrière-Hématotesticulaire



**Eau 1 :** Modification de la TEER sur la durée de la culture.  
**Eaux 2 à 4 :** Effets plus faibles.

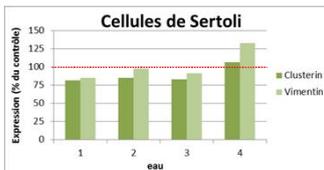
## Expression des gènes de jonctions cellulaires



**Eau 1 :** Diminution de l'expression des gènes de jonctions **Tight** et **Gap**.  
**Eau 4 :** Augmentation de l'expression d'un gène de jonctions **Gap**.  
**Eaux 2 et 3 :** Effets moins marqués sur l'expression des gènes de jonctions cellulaires.

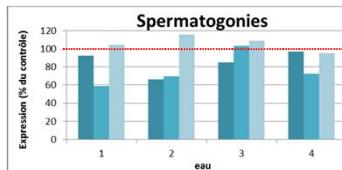
## Expression des gènes caractéristiques des différentes populations cellulaires de la spermatogenèse

### Cellules somatiques

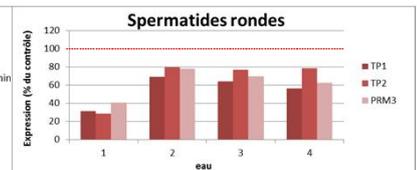
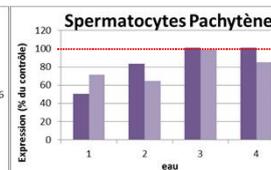


**Aucun effet** sur l'expression des gènes spécifiques des cellules somatiques.

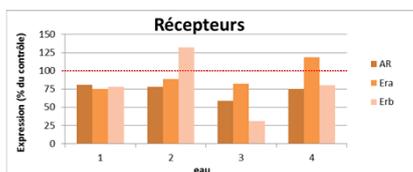
### Cellules germinales



**Eau 1 :** Légère diminution de l'expression des gènes spécifiques des spermatocytes pachytènes.  
Importante diminution de l'expression des gènes spécifiques des spermatides rondes.  
**Pas d'effet important des eaux 2, 3 et 4** sur l'expression des gènes spécifiques des cellules germinales.



## Expression des gènes de récepteurs aux androgènes (AR) et aux oestrogènes (ER)



**Eaux 1 et 3 :** Diminution légère (eau 1) ou importante (eau 3) de l'expression des gènes des récepteurs aux androgènes et aux oestrogènes.

**Pas d'effet marqué des eaux 2 et 4.**

## CONCLUSION

Le système de culture Bio-Alter® a permis de mettre en évidence que la qualité de l'eau de consommation courante peut avoir un **impact sur la spermatogenèse**.

Par exemple, la présence de l'**eau du robinet (eau 1)** a altéré la qualité de la barrière hémato-testiculaire et a provoqué une diminution de l'expression des gènes des jonctions cellulaires et des spermatides rondes.

L'effet de l'eau sur la spermatogenèse peut être associé à un **effet perturbateur endocrinien** car l'expression des gènes des récepteurs aux androgènes et aux oestrogènes a été modifiée dans plusieurs cas.

En combinant l'étude de la TEER à celle de l'expression de gènes spécifiques, nous avons développé une **méthode pertinente** permettant l'évaluation de la toxicité de différentes eaux sur la fertilité masculine et la mise en évidence de certains mécanismes d'actions.

## Références

1. Carlsen et al. (1992) BMJ 305:609-613
2. Van Dijk-Looijaard et al. (2000) Food and Chemical Toxicology 38:37-42
3. Casals-Casas et al. (2011) Annu Rev Physiol 73: 135-162
4. Staub et al. (2000) Experimental Cell Research 206: 85-95
5. Hue et al. (1998) Biol Reprod 59: 379-387
6. Carette et al. (2013) Toxicol Appl Pharmacol 168: 27-36
7. Godet et al. (2008) ; Dev Biol 315: 173-188