

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

Guillaume Martin¹, Antonine Blondet¹, Emilie Christin¹, Marie-Hélène Perrard², Philippe Durand¹

¹ Kallistem, ENS Lyon, France ; ² INSERM U 846, Lyon, France

INTRODUCTION

La **baisse de la fertilité masculine** est un fait avéré : le nombre de spermatozoïdes par éjaculat a diminué de 50% au cours des 50 dernières années ^{ref 1}.

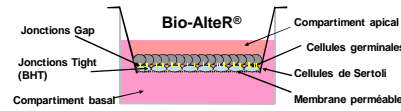
L'**eau potable peut contenir de nombreuses molécules toxiques** (pesticides, métaux lourds, résidus médicamenteux) ^{ref 2}. Certains de ces composés sont notamment des perturbateurs endocriniens. De plus, les effets de ces molécules peuvent se potentialiser (effet **cocktail**) ^{ref 3}.

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

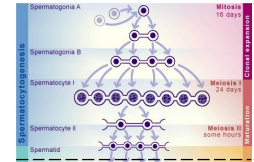
1. Les **tubes séminifères de rats** Sprague Dawley juvéniles (22 jours) sont mis en culture dans le système Bio-Alter ^{ref 4,7}.



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.

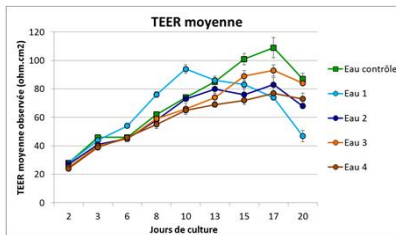


Etapes réalisées *in vitro* dans le système Bio-Alter

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

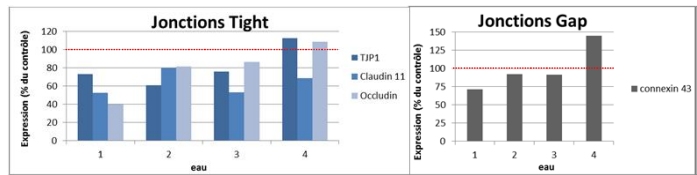
- ~ Evaluation de l'intégrité de la barrière hémato-testiculaire tout au long de la culture par mesure de la **TEER** (Trans Epithelial Electric Resistance),
- ~ Mesure à J20 de l'expression de différents gènes caractéristiques de la spermatogenèse (par **RT-qPCR**).

Barrière-Hématotesticulaire



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

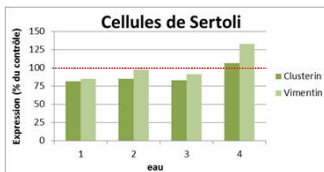
Expression des gènes de jonctions cellulaires



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.

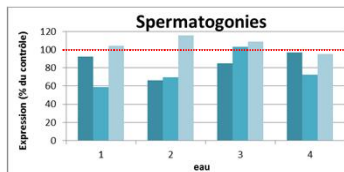
Expression des gènes caractéristiques des différentes populations cellulaires de la spermatogenèse

Cellules somatiques

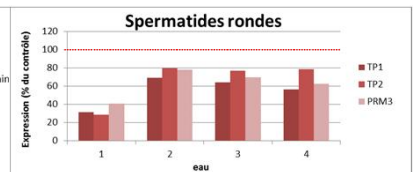
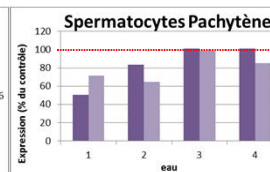


Aucun effet sur l'expression des gènes spécifiques des cellules somatiques.

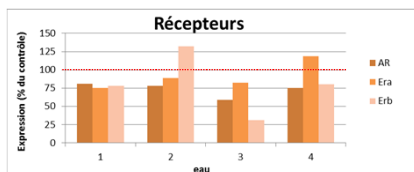
Cellules germinales



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