UNIVERSITE DE LA MEDITERANNEE-FACULTE DE MEDECINE-MARSEILLE

Ecole Doctorale SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT (ED251-EDSE)

Spécialité Environnement et Santé

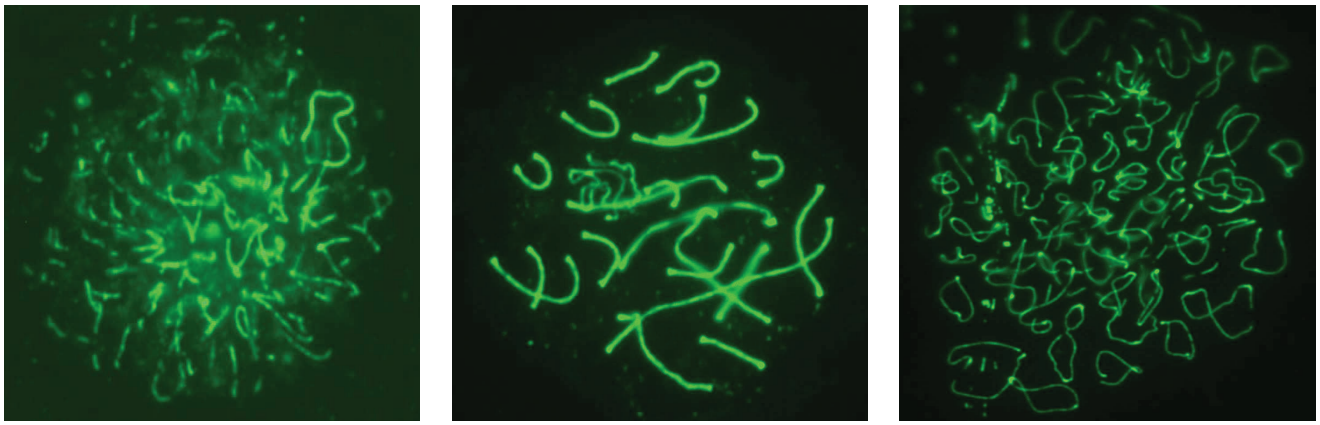
Cendrine GEOFFROY-SIRAUDIN

Marseille, le 13 Décembre 2010

EFFETS DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LA SPERMATOGENESE

Déclin des paramètres du sperme chez l'homme et

Impact des métaux lourds sur la spermatogenèse du rat ex-vivo



Jury de la Thèse :

Professeur Marie-Roberte GUICHAOUA, Co-Directrice
Docteur Philippe DURAND, Co-Directeur
Professeur Louis BUJAN, Rapporteur
Docteur Georges POINTIS, Rapporteur
Professeur Alain BOTTA, Président

UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE

FACULTE DE MÉDECINE DE MARSEILLE

EFFETS DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LA SPERMATOGENESE

Déclin des paramètres du sperme chez l'homme et impact des métaux lourds sur la spermatogenèse du rat ex-vivo

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Le 13 Décembre 2010

Par Mme Cendrine GEOFFROY-SIRAUDIN

Née le 08 Février 1979 à Marseille

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ de la MÉDITERRANÉE

SPECIALITE: Environnement et Santé

Membres du Jury de la Thèse :

Professeur Marie-Roberte GUICHAOUA, Co-Directrice
Docteur Philippe DURAND, Co-Directeur
Professeur Louis BUJAN, Rapporteur
Docteur Georges POINTIS, Rapporteur
Professeur Alain BOTTA, Président

Titre: Effets des facteurs environnementaux sur la spermatogenèse:
Déclin des paramètres du sperme chez l'homme et impact des métaux lourds sur la spermatogenèse du rat ex-vivo.

Résumé

Au cours des dernières décennies, un contexte alarmant de déclin des paramètres du sperme et d'accroissement constant des pathologies génitales masculines a été décrit dans de nombreux pays industrialisés.

Notre travail évalue dans un premier temps l'évolution des paramètres spermatiques chez 11 330 hommes ayant consulté pour infertilité conjugale au Centre de Procréation Médicalement Assistée du CHU de Marseille entre 1988 et 2007. Les données ont été recueillies de manière rétrospective et analysées par régression linéaire multi-variée afin de tenir compte de l'effet lié à l'âge. Nous montrons une diminution significative des principaux paramètres du sperme: concentration en spermatozoïdes (-1.4% par an), numération totale en spermatozoïdes (-1.5% par an), mobilité progressive rapide (-5.6% par an) et morphologie normale (-1.9% par an). Les possibles biais de selection ont été discutés. L'effet de l'environnement sur notre fonction de reproduction est l'une des hypothèses principales évoquées pour expliquer ce phénomène.

Nous montrons ensuite comment un modèle de culture de tubes séminifères de rat en chambre bicamérale, couplé à des techniques d'étude de la méiose en immunocytochimie peut être utilisé comme nouvel outil de reprotoxicologie. Nous décrivons tout d'abord avec l'anticorps anti-SCP3 la prophase de première division méiotique chez le rat in-vivo et nous validons le modèle de culture par comparaison entre les résultats des cellules obtenues in vivo et ceux des cellules obtenues ex-vivo. Nous montrons ensuite grâce à ce système l'impact du Chrome Hexavalent et du Cadmium sur la méiose du rat. Ces 2 métaux lourds, largement présent dans notre environnement, peuvent être responsables d'atteintes importantes des cellules méiotiques, y compris à de faibles doses pouvant correspondre à celles retrouvées chez des individus exposés dans leur vie quotidienne et/ou professionnelle.

Mots Clés: Déclin des paramètres du sperme; Spermatogenèse, Culture de tubes séminifères, Rat, Méiose, Chrome hexavalent, Cadmium

Title: Effect of environmentl factors on spermatogenesis:
decline of sperm parameters in human and impact of heavy metals on rat spermatogenesis obtained ex-vivo

Abstract:

In recent decades, an alarming decline of sperm parameters and a constant increase in male genital diseases has been described in many industrialized countries.

In a first time, our study evaluates the evolution of sperm parameters in 11 330 men consulting for infertility of their couple in the Reproduction Biology Laboratory of an University Hospital in Marseilles between 1988 and 2007. Data were collected retrospectively and analyzed by multivariate linear regression to take into account the effect related to age. We show a significant decrease of the main sperm parameters: sperm concentration (-1.4% per year), total sperm count (-1.5% per year), rapid progressive motility (-5.6% per year) and normal morphology (-1.9 % per year). Possible selection bias were discussed. The effect of environment on our reproductive function is one of the main hypothesis to explain this phenomenon.

Secondly, we show how a rat seminiferous tubule culture in a bicameral chamber system, coupled with study of meiosis by immunocytochemistry can be used as a new tool of reprotoxicology. We first describe with an anti-SCP3 antibody the first prophase of rat meiosis and we validate the model of culture by comparing the results obtained on cells obtained after in vivo spermatogenesis and those of cells obtained ex-vivo. Then, we show using this system, the impact of hexavalent chromium and cadmium on rat meiosis. These two heavy metals, widely present in our environment, may cause substantial impairment of meiotic cells, including low doses which can fit with those found in individuals exposed in their personnal life and / or occupational training.

Key words: Decline of sperm parameters; Spermatogenesis, Seminiferous tubule culture, Rat, Meiosis, Hexavalent chromium, Cadmium

Laboratoire d'accueil de la thèse

Ce travail a été réalisé sous la direction conjointe du **Pr MR Guichaoua** au laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale (E4 1784, dirigée par le Pr A Botta), Université de la Méditerranée, ECCOREV Europôle de l'Arbois, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 5 et du **Dr Ph Durand** à l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, UMR 5242 CNRS INRA Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon 1, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon, cedex 07.

Il a été rendu possible par l'étroite collaboration entre le Pr Marie-Roberte Guichaoua qui a apporté sa grande expérience de la méiose et de ses anomalies et le Docteur Philippe Durand qui nous a fait bénéficié de son expertise concernant le modèle de culture de tubes séminifères de rat.

Remerciements

A mon Jury de Thèse,

Monsieur le Pr Alain Botta

Vous me faites l'honneur de présider ce jury. Je vous remercie de m'avoir accueillie au laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale et d'avoir développé dans cette unité une sensibilité toute particulière aux thèmes de repro-toxicologie. Durant ces 3 dernières années, je me suis toujours sentie intégrée dans une équipe de Toxicologie où la Biologie de la Reproduction à une place de choix.

Madame le Pr Marie-Roberte Guichaoua

2ème thèse….. 3 ans après celle de médecine, 2ème direction de mon travail…...Je vous remercie infiniment pour votre aide précieuse et votre disponibilité. Ce travail n'aurait pas été possible sans votre connaissance irremplaçable de la méiose et de ses anomalies. Depuis notre « collaboration humaine » dans le travail sur les microdélétions AZFc, vous avez toujours été là pour me guider dans la découverte des spermatocytes du rat ! Ces années de thèse à vos côtés m'auront enseigné ce qu'est la recherche, ses réussites et ses difficultés. Je vous en suis très reconnaissante.

Monsieur le Dr Philippe Durand

Je te remercie de tout cœur d'avoir accepté de co-diriger le travail de thèse d'une marseillaise ! Grâce à ta connaissance unique de la culture cellulaire germinale chez le rat, nous avons pu développer une innovation prometteuse pour la recherche en repro-toxicologie. Je tiens à te remercier pour ta disponibilité, au téléphone ou par mail, à Marseille ou à Lyon, ton aide a été cruciale depuis les mises au point technique jusqu'à la finalisation des articles.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le **Pr Louis Bujan** et Monsieur le **Dr Georges Pointis** qui me font l'honneur de siéger dans ce jury et d'avoir pris sans hésiter le temps de juger ce travail.

A toute l'**équipe de l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon**
Je tiens à vous remercier pour votre implication dans le lourd travail de culture cellulaire. Je remercie en particulier le **Docteur Marie –Hélène Perrard** qui s'est beaucoup investie dans cette collaboration. Votre professionnalisme et votre simplicité ont tout mon respect.

A Monsieur le **Pr Jean-Marie Grillo**
Je vous remercie pour votre soutien durant ces années d'assistanat et de thèse. Merci de m'avoir accordé la disponibilité nécessaire pour réaliser ce travail.

A toutes……des unités Spermio-FIV-CECOS du **Laboratoire de Biologie de la Reproduction.** Vous avez ces 3 dernières années été le témoin de nombreuses heures passées dans mon bureau ou celui de Marie à parler « rat, toxiques en tout genre et pachytène…. ». Merci pour votre soutien technique, psychologique ou « caféiné » !
Un merci tout particulier à **Jeanne Perrin** et **Catherine Guillemain** avec qui je partage plus que de simples relations professionnelles.

A tous les membres du **Laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale** pour leur aide et leurs conseils techniques. Un merci particulier à **Florence Chaspoul** et au **Pr Philippe Gallice** pour leur aide décisive dans le choix des toxiques.

A l'homme que j'aime…….

A mes filles chéries…….

A ma famille……..

A tous mes amis……promis, je n'aurais plus de carte d'étudiant l'année prochaine !

Sommaire

Résumé **3**

Laboratoire d'accueil de la thèse **5**

Remerciements **6**

Sommaire **8**

INTRODUCTION **13**

RAPPELS **18**

I- La spermatogenèse, particularités chez le rat **19**

1- Définition 19

2- Description 19

a- Multiplication des spermatogonies 20

b- Spermatocytes et méiose 24

c- Spermatides et spermiogenèse 24

3- Spermatogenèse et cycle de l'épithélium séminifère 25

4- La cellule de Sertoli 29

5- Régulation neuro-endocrine de la spermatogenèse 38

a- Le niveau hypothalamique 39

b- Le niveau hypophysaire 39

c- Le niveau testiculaire 40

6- Régulation thermique de la spermatogenèse 43

II- La méiose: description générale et particularités chez le rat 45

1- Chronologie des divisions (fig. 10) 45

a- La première division méiotique 45

b- La deuxième division méiotique 47

2- Les grands évènements de la méiose 50

a- Cohésion des chromatides sœurs 50

b- Appariement des chromosomes homologues 51

c- Recombinaison génétique et formation des chiasmas 55

MATERIELS ET METHODES 59

I- Le modèle ex-vivo : culture de tubes séminifères 60

1- Présentation 60

2- Intérêts du modèle 62

II- Techniques d'immunocytochimie pour l'étude de la méiose 63

1- Les anticorps utilisés 63

2- Description de la technique 66

3- Les images obtenues 66

a- Aspect des sous stades de prophase I chez le rat 66

b- Analyse qualitative 68

OBJECTIFS 70

PREMIERE PARTIE

Etude de l'évolution des paramètres du sperme entre 1988 et 2007 dans la région marseillaise chez 11 330 hommes ayant consulté au centre de Procréation Médicalement Assistée 74

ARTICLE 1 :

Decline in semen quality among 11 330 men visiting an infertility centre over a 20-year period in Marseilles Geoffroy-Siraudin C, Loundou AD, Courbière B, Achard V, Grillo JM, Perrard MH, Durand Ph, Guichaoua MR 81

DEUXIEME PARTIE

Impact des métaux lourds sur la spermatogenèse du rat ex-vivo 107

I- Validation du modèle de culture de tubes séminifères de rat comme nouvel outil de reprotoxicologie 108

1- Intérêt du modèle 108

2- Description de la méiose in vivo 109

3- Cinétique de différenciation des cellules en culture grâce à la bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 111

ARTICLE 2 :

Analysis of the intratesticular control of spermatogenesis by ex-vivo approaching Perrard MH, Prisant N, Geoffroy-Siraudin C, Segretain D, Pointis G, Guichaoua MR, Durand Ph 113

ARTICLE 3 :

Analyse de la spermatogenèse ex-vivo Application à l'analyse de la toxicité testiculaire Perrard MH, Grenet C, Prisant N, Geoffroy-Siraudin C, Segretain D, Guichaoua MR, Pointis G, Durand Ph 120

II- Impact du Chrome Hexavalent (Cr VI) sur la spermatogenèse du rat 127

1- Le chrome hexavalent (Cr VI) : caractéristiques 127

2- Effet du Chrome hexavalent sur la spermatogenèse du rat obtenue ex-vivo 129

ARTICLE 4 :

Validation of a rat seminiferous tubule culture model as a suitable system for studying toxicant impact on meiosis of hexavalent chromium Geoffroy-Siraudin C, Perrard MH, Chaspoul F, Lanteaume A, Gallice Ph, Durand Ph, Guichaoua MR. 131

III- Impact du Cadmium (Cd) sur la spermatogenèse du rat obtenue ex-vivo (article en cours de rédaction) 144

1- Introduction 144

a- Caractéristiques du cadmium (Cd) 144

b- Sources d'exposition 144

c- Toxicité 145

2- Matériel et méthodes 149

a- Cultures de tubes séminifères de rat 149

b- Analyse en Cytométrie de Flux 149

c- Méthodes cytologiques 150

d- Analyse au microscope 150

e- Analyse statistique 151

3- Résultats 151

a- Effet du cadmium sur la richesse cellulaire (Figure 18) 151

b- Chronologie de la prophase de première division méiotique en présence de Cadmium 155

c- Analyse qualitative des spermatocytes pachytène en présence de cadmium 157

4- Discussion 160

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION..... 164

PERSPECTIVES..... 170

ANNEXES..... 174

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 179

INTRODUCTION

Environ 15 % des couples consultent pour « difficulté à concevoir » au moins une fois dans leur vie, soit d'après l'Agence de la Biomédecine, 60 000 couples chaque année en France. Bien qu'il soit classiquement décrit que les étiologies des infertilités se répartissent de façon globalement équitable entre causes féminines, masculines ou mixtes, l'observation de l'évolution des paramètres du sperme dans les 5 dernières décennies est alarmante. C'est la publication de Carlsen et coll. en 1992 qui, selon une méta-analyse de 61 études réalisées dans le monde entier, révélait que le volume séminal et la concentration des spermatozoïdes avaient diminué d'environ 50% depuis 50 ans. Puis Auger et coll. (1995) ont montré une diminution des trois principaux paramètres du sperme (numération, mobilité, formes typiques) chez 1750 hommes donneurs de sperme, de 1973 à 1992. Ces résultats ont été confirmés par d'autres études faites dans les populations générales de différents pays (Irvine et coll. 1996, Van Waeleghem et coll. 1996, Swan et coll. 1997, Andersen et coll. 2000) mais aussi chez les hommes consultant pour infertilité clinique (Lackner et coll. 2005). Ces travaux ont soulevé quelques controverses (Olsen et coll. 1995, Fish et coll.1996), en effet des études finnoises et américaines (Suominen et Vierula 1993, Fish et coll.1996) n'ont pas montré d'importantes variations des paramètres du sperme qui restent dans les limites de la normale. Cependant on peut admettre qu'il existe réellement un léger et constant déclin de la concentration des spermatozoïdes (Lackner et coll. 2005), mais il ne semblait pas jusqu'à présent que l'on atteigne des valeurs pouvant mettre en danger la fertilité des hommes. Cependant, une récente étude Danoise (Jensen et coll. 2008) montre, parallèlement au déclin des paramètres du sperme, un déclin de la fécondité des couples qui pose un réel problème de santé publique.

Parallèlement à l'altération des paramètres de sperme, d'autres pathologies génitales telles que la cryptorchidie, l'hypospadias, le cancer du testicule, sont en constante augmentation en Europe (Giwercman et coll. 1993). Ces observations ne sont pas une particularité de l'espèce humaine, en effet de telles perturbations ont aussi été observées chez

l'animal : féminisation, modifications du comportement sexuel, diminution du volume testiculaire, baisse de la fécondité, mais aussi, faible éclosabilité et viabilité réduite de la progéniture (McLachlan 2001, Witorsch 2002). Les troubles de la reproduction chez l'homme et l'animal ont été rapidement associés avec l'accroissement des concentrations et des variétés de toxiques dans notre environnement. En effet, un grand nombre de substances toxiques sont connues pour avoir des effets néfastes sur la fonction de reproduction, en particulier sur la spermatogenèse. Il est actuellement difficile d'établir un lien entre les anomalies du spermogramme et un produit toxique étant donné la multiplicité des toxiques auxquels les êtres vivants sont soumis, mais aussi parce que la fonction de reproduction a été jusqu'à présent la fonction la moins explorée par les toxicologues.

Afin de protéger les salariés vis-à-vis des produits chimiques toxiques pour la reproduction, il existe d'ores et déjà une réglementation européenne traduite en droit français : la classification CMR (Cancérogènes, Mutagènes et Toxiques pour la Reproduction). Elle permet de classer et d'étiqueter des substances qui sont susceptibles d'entraîner une altération des fonctions ou de la capacité de reproduction chez l'homme ou la femme ou d'induire des effets néfastes non héréditaires sur la descendance (INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité). Cette classification définit trois catégories :

La catégorie 1 : ce sont les substances connues pour altérer la fertilité dans l'espèce humaine ou celles connues pour provoquer des effets toxiques sur le développement de l'espèce humaine.

La catégorie 2 : ce sont les substances devant être assimilées à des substances altérant la fertilité dans l'espèce humaine ou celles devant être assimilées à des substances provoquant des effets toxiques sur le développement.

Les catégories 1 et 2 sont étiquetées « toxiques ».

La catégorie 3 : ce sont les substances préoccupantes pour la fertilité dans l'espèce humaine ou les substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets toxiques possibles sur le développement. Les substances de cette catégorie sont étiquetées « nocives »

Actuellement 209 substances sont classées et étiquetés toxiques pour la reproduction, pour l'atteinte de la fertilité et/ou pour des effets sur le développement. La nouvelle réglementation REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) a pour objectif l'amélioration des connaissances des propriétés chimiques, toxiques et écotoxiques des substances utilisées dans la vie courante. Environ 30 000 substances chimiques, produites en quantité supérieure à 1 tonne par an, seront à terme concernées par cette procédure qui sera gérée par l'agence européenne des produits chimiques (ECHA : European Chemicals Agency). Les substances particulièrement préoccupantes, telles que les CMR, PBT (persistantes, bioaccumulables et toxiques), vPvB (très persistantes et très bioaccumulables) ou les perturbateurs endocriniens, devront obtenir l'autorisation de la Commission européenne, qui s'appuiera sur les recommandations de l'ECHA. Leur utilisation pourra être soumise à restriction, voire être interdite. Selon la Commission européenne, REACH devrait coûter à l'industrie chimique et ses utilisateurs entre 2.8 et 5.2 milliards d'euros sur 15 ans. Les avantages anticipés pour l'environnement et la santé humaine seraient de l'ordre de 50 milliards d'euros sur 30 ans. Pour les molécules concernées par REACH, il sera nécessaire d'effectuer une batterie de tests physico-chimiques, d'écotoxicité et de toxicité. L'expérimentation animale nécessaire à ces tests pourra entraîner l'utilisation de plusieurs millions d'animaux (Hartung et Rovida. 2009) et REACH et la directive européenne 86/609/CEE2 encouragent l'utilisation de méthodes alternatives comme les modèles cellulaires.

Dans ce travail, nous avons donc tout d'abord évalué l'évolution des paramètres du sperme chez 11 330 hommes ayant consulté pour infertilité conjugale au Centre de Procréation Médicalement Assistée de l'hôpital de la Conception à Marseille entre 1988 et 2007.

Puis nous avons validé le modèle de culture de tubes séminifères de rat de Ph Durand et collaborateurs comme nouvel outil pour des études toxicologiques. Nous avons choisi d'initier ces travaux par l'étude de l'effet des 2 métaux lourds, le Chrome (VI) et le Cadmium, sur la spermatogenèse du rat.

RAPPELS

I- La spermatogenèse, particularités chez le rat

1- Définition

La spermatogenèse est le processus qui transforme une cellule germinale indifférenciée, la spermatogonie, en cellules germinales mâles hautement différenciées, les spermatozoïdes. Ce processus se déroule dans les tubes séminifères du testicule où les cellules germinales en différenciation sont étroitement liées aux cellules de Sertoli.

2- Description

Comme dans l'espèce humaine, la spermatogenèse du rat débute à la puberté et se déroule durant toute la vie adulte. Chez le rat, le temps nécessaire à la transformation d'une spermatogonie en spermatozoïdes est d'environ 50 jours : 48 jours chez le rat Sherman, 53.2 jours chez le rat Wistar (Clermont et coll. 1959), et 51.6 jours chez le rat Sprague-Dawley (Clermont et Harvey. 1965). La spermatogenèse comprend trois étapes:

- une phase de multiplication des cellules germinales indifférenciées (spermatogonies)
- une phase de méiose qui intéresse les spermatocytes
- une phase de différenciation qui transforme les spermatides en spermatozoïdes : la spermiogenèse.

<table>
<tr><td colspan="5">Phase de Multiplication goniale</td><td>10.5 jours</td></tr>
<tr><td rowspan="7">Méiose</td><td rowspan="5">Prophase</td><td rowspan="5">17.5 jours</td><td>Pré-leptotène</td><td>3.5 jours</td><td rowspan="7">19 jours</td></tr>
<tr><td>Leptotène</td><td>1 jour</td></tr>
<tr><td>Zygotène</td><td>2 jours</td></tr>
<tr><td>Pachytène</td><td>11 jours</td></tr>
<tr><td>Diplotène</td><td>< 1jour</td></tr>
<tr><td>Fin I^{ère} division</td><td>>0.5 jours</td><td rowspan="2"></td><td rowspan="2"></td></tr>
<tr><td>II^{ème} division</td><td>> 0.5 jours</td></tr>
<tr><td colspan="5">Spermiogenèse</td><td>20.5 jours</td></tr>
</table>

Figure 1: Chronologie de la spermatogenèse chez le rat d'après les données de Ilse-Dore Adler. 1996

a- Multiplication des spermatogonies

D'après la revue de Hermo et coll. 2010.

Les spermatogonies sont les cellules germinales les plus périphériques dans le tube séminifère. Ce sont des cellules diploïdes qui se trouvent dans le compartiment basal, au contact de la base des cellules de Sertoli. La présence de cellules souches permet aux spermatogonies d'assurer à la fois leur propre auto-renouvellement et d'alimenter la lignée germinale tout au long de la vie afin de produire en continu des spermatozoïdes. Ces dernières années, les travaux sur le renouvellement et l'entrée en division de ces cellules se sont multipliés, portés par les avancées dans les thérapies cellulaires de transplantation de cellules souches.

Historiquement, dans les années 50, ce sont les travaux de Leblond et Clermont (1952) qui ont identifiés ces cellules souches spermatogoniales et leur capacité d'autorenouvellement, posant les concepts de base qui ont permis toutes les études ultérieures. Leblond et Clermont ont ainsi montré qu'il existait plusieurs classes de spermatogonies. Chez le rat, 6 générations de spermatogonies différenciées sont décrites : A1, A2, A3, A4, Intermédiaire (In) et B. Ces cellules apparaissent progressivement dans le temps et maturent en acquérant un noyau de plus en plus petit contenant de plus en plus d'hétérochromatine. En 1971, Huckins (1971a,b,c), complète la description en proposant chez le rat 3 catégories de spermatogonies :

- Les cellules souches spermatogoniales nommées As
- Les cellules spermatogoniales de prolifération : Apr et Al, assurant l'auto-renouvellement
- Et les cellules spermatogoniales entrant en différenciation : A1 à A4, In et B

La production par une cellule As d'une paire de cellules filles de type Apr marque chez le rat, le signal de la différenciation. Chacune de ces cellules Apr réalise alors un nombre variable de divisions synchronisées, à des intervalles de temps réguliers. Cela aboutit à une augmentation de l'effectif cellulaire et produit des clones de cellules germinales qui débutent cycliquement leur différenciation pour devenir des spermatonogies A1, puis A2, jusqu'aux cellules B. Chaque spermatogonie B devient un spermatocyte primaire pré-leptotène (spermatocytes I), réalise une synthèse d'ADN pré-méiotique et entre en prophase de première division méiotique. Cette phase de différenciation spermatogoniale dure de 10 à 13 jours chez le rat, soit la durée approximative d'un cycle de l'épithélium séminifère. La quantité de spermatozoïdes produits par gramme de testicule dépend étroitement du nombre de générations de spermatogonies filles issues de la division d'une spermatogonie souche.

Ces différents types cellulaires ont des propriétés propres et réagissent différemment à leur exposition à des agents physiques ou chimiques. Chez le rat, les spermatogonies As ont

été décrites comme résistantes aux irradiations : elles se remettent à proliférer pour reconstituer l'épithélium séminifère après exposition aux radiations (Dym et Clermont. 1970; Huckins. 1978).

Ce modèle est depuis 15 ans le plus largement reconnu par la communauté scientifique (de Rooij. 1998, 2001 ; de Rooij et Grootegoed. 1998 ; de Rooij et Russell. 2000 ; Meistrich et Van Beek. 1993 ; Yoshida et coll. 2004). Il est cependant bien connu que le nombre réel de spermatocytes pré-leptotènes formés au terme du processus est bien inférieur au calcul théorique des divisions cellulaires (Li et coll. 1998). Il existe en effet d'importants phénomènes d'apoptose durant toute la spermatogenèse et il a été estimé que 75% des spermatogonies n'atteindront pas le stade de spermatozoïde mature (Huckins. 1978).

Au total, les cellules souches spermatogoniales ont 3 destinées possibles :

- L'auto-renouvellement pour maintenir le pool de cellules souches
- L'entrée en différenciation pour aboutir à la production de spermatozoïdes matures
- La mort cellulaire par apoptose

Actuellement, les souches souches As sont nommées SSCs (pour spermatogonial stem cells). Elles sont au cœur de nombreuses études ayant pour objectif la thérapie cellulaire et leur utilisation en transplantation. La grande problématique d'aujourd'hui est de comprendre les mécanismes régulant la balance entre l'auto-renouvellement et l'entrée en différenciation de ces SSCs. Cet équilibre dépend d'une part de l'expression de gènes dans les cellules souches elles-mêmes et d'autre part de signaux extrinsèques du microenvironnement des cellules germinales : on parle de niche des SSCs. La régulation de cette niche évolue avec l'âge du sujet (pour revue, Dadoune. 2007)

Peu de facteurs de transcription, spécifiques des cellules germinales sont connus comme indispensables à cette balance. Plzf, protéine répressive de la transcription; et TAF-4b, composant du complexe ARN-polymérase spécifique des cellules germinales, orientent les SSCs vers l'autorenouvellement. Tandis que les facteurs de transcription Sohlh 1 et 2 induisent leur entrée en différenciation.

Les produits des cellules de Sertoli jouent un rôle primordial dans la régulation du microenvironnement ou niche des SSCs (fig 2). Le GNDF (Glial cell line Derived Neurotrophic Factor) pendant la période périnatal (via son recepteur tyrosine kinase c-RET) puis l'ERM (Ets related Molecule) à la puberté sont indispensables pour l'auto-renouvellement des SSCs. Le SCF (Stem Cell factor), via son recepteur tyrosine kinase c-KIT, est lui nécessaire à la différenciation (Dadoune, 2007).

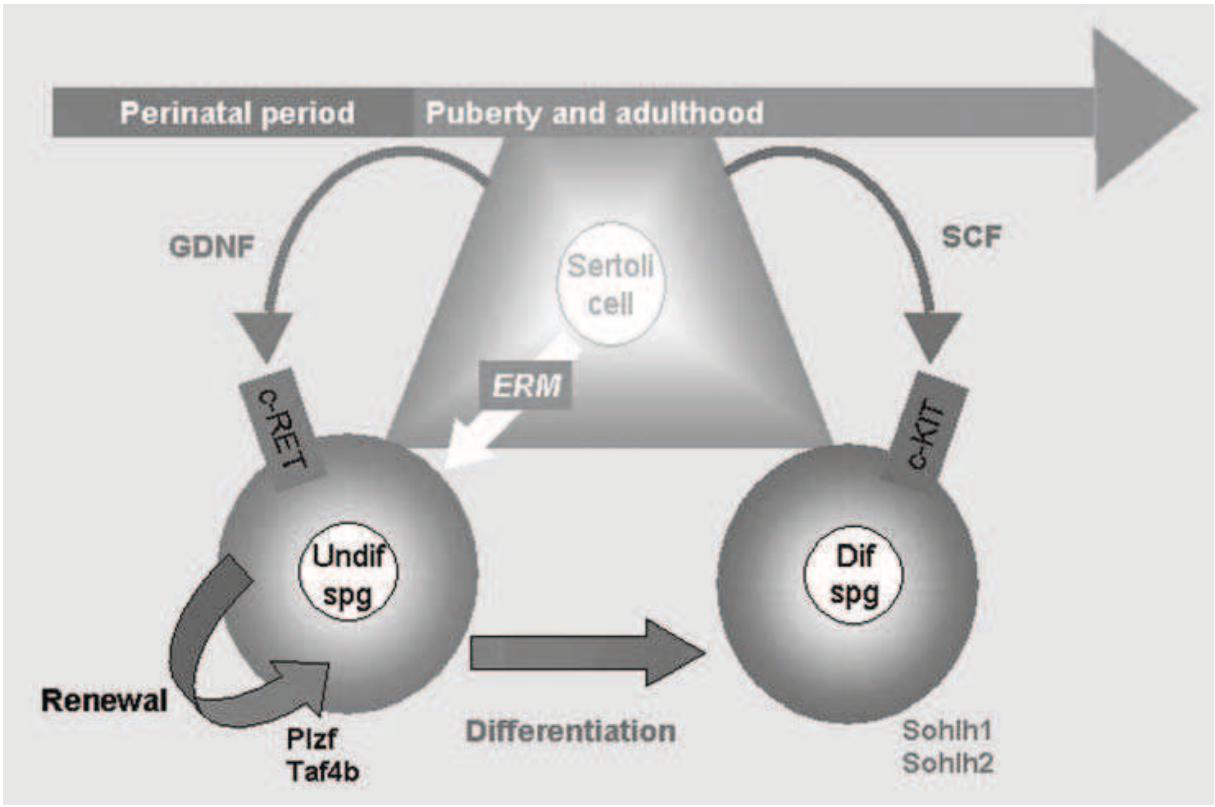


Figure 2 : Les acteurs clés impliqués dans le renouvellement et l'entrée en différenciaion des cellules souches spermatogoniales (SSCs). D'après Dadoune. (2007)

b- Spermatocytes et méiose

La différenciation des spermatocytes I intéresse essentiellement leur noyau, dans lequel se déroule la méiose (cf rappels II). Au stade zygotène, les spermatocytes I passent dans le compartiment adluminal du tube séminifère. Ils sont localisés à distance de la membrane basale, sous forme de cellules sphériques logées entre les cellules de Sertoli. Le spermatocyte I subit sa première division de méiose, et donne naissance à deux spermatocytes II. Les spermatocytes II sont de plus petite taille que les spermatocytes I. Ils sont également logés entre les prolongements des cellules de Sertoli, plus haut dans le compartiment adluminal. Ces cellules germinales n'ont qu'une existence brève et s'observent difficilement sur les coupes histologiques. La deuxième division de méiose se produit très rapidement et aboutit à la formation de deux spermatides haploïdes.

c- Spermatides et spermiogenèse

La métamorphose d'une spermatide en spermatozoïde est un phénomène cytologique complexe au cours duquel les organites cellulaires subissent des transformations morphologiques profondes. Quatre événements majeurs caractérisent cette transformation :

- **La formation d'une vésicule riche en enzymes qui s'étale progressivement sur une partie du noyau, c'est l'acrosome**. Dans l'acrosome du spermatozoïde, sont présentes des protéines synthétisées au cours du stade pachytène. L'appareil de golgi migre au pôle apical du noyau de la spermatide. Des vésicules s'en détachent et fusionnent pour former une seule vésicule proacrosomique qui s'étale progressivement sur la partie antérieure du noyau et se condense. L'acrosome contient des enzymes dont l'acrosine et la hyaluronidase qui jouent un rôle dans la traversée de la zone pellucide par les spermatozoïdes lors de la fécondation.

- **L'élongation du noyau et sa condensation**. Les histones de type somatique riches en lysine sont remplacées en deux temps par des protéines dites intermédiaires encore riches en lysine, puis par des protamines riches en cystéine et arginine qui s'associent aux chaînes d'ADN et entre elles par des ponts disulfures.
- **La formation d'un flagelle** à partir du centriole distal, qui s'associe avec un système lui fournissant l'énergie, les mitochondries.
- **La mise en place de protéines qui jouent un rôle fondamental dans les mécanismes de la fécondation** : reconnaissance et fixation à la membrane plasmique de l'ovocyte.

Les spermatozoïdes ainsi formés sont libérés dans la lumière du tube séminifère lors de la spermiation et sont entraînés le long des tubes séminifères par le fluide testiculaire sécrété par les cellules de Sertoli

3- Spermatogenèse et cycle de l'épithélium séminifère

D'après Clermont. 1972; et Hermo et coll. 2010

En plus des transformations cytologiques que nous venons de décrire, les cellules germinales présentent, au cours de leur transformation en spermatozoïdes, un certain nombre de caractéristiques qui déterminent l'aspect histologique des tubes séminifères :

- La durée de la spermatogenèse et de chacune de ses phases est constante pour une espèce donnée
- Les spermatogonies souches de renouvellement entrent en spermatogenèse périodiquement et à des intervalles réguliers d'une durée relativement courte : 12 jours chez le rat Sherman (Clermont et coll. 1959)
- Ces spermatogonies souches de renouvellement entrent en spermatogenèse non plus individuellement mais en groupes de cellules reliées entre elles par des ponts

cytoplasmiques. Chez le rat, on observe ainsi fréquemment, le long de la paroi des tubes séminifères, des groupes de 8 ou 16 spermatogonies souches toutes reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques. Les cellules qui dérivent ensuite par mitose ou méiose de ces cellules souches restent également attachées les unes aux autres. Cependant, ne sont reliées entre elles que les cellules germinales d'un type donné qui sont au même stade de développement. Ces ponts cytoplasmiques persistent jusqu'à la fin de la spermiogenèse alors que les spermatides se défont de leurs corps résiduels.

L'étude de l'arrangement topographique de la population spermatogoniale le long de la paroi des tubes séminifères des rongeurs a bien montré que plusieurs groupes homogènes adjacents mais distincts de cellules souches entrent en spermatogenèse d'une façon à peu près synchrone. (Clermont et Bustos-Obregon. 1966, Clermont et Hermo 1975). Ces cellules au même stade forment une « génération ». L'examen histologique de la paroi des tubes séminifères montre la présence de 4 ou 5 générations différentes de cellules germinales disposées en couche superposées. Les générations de cellules germinales forment un certain nombre d'associations cellulaires de composition constante. Ainsi par exemple, un type donné de spermatogonies sera toujours associé avec des spermatocytes ou des spermatides à des stades précis de développement. Ces regroupements de cellules correspondent à autant de stades d'un « cycle de l'épithélium séminifère » (figure 3). Leblond définit ce cycle en 1952 comme « la série complète des associations cellulaires qui apparaissent avec le temps et dans un ordre précis, à un endroit donné du tube séminifère. Chez le rat sherman, la durée du cycle de l'épithélium séminifère est de 12 jours et 14 stades sont identifiés (figure 4)

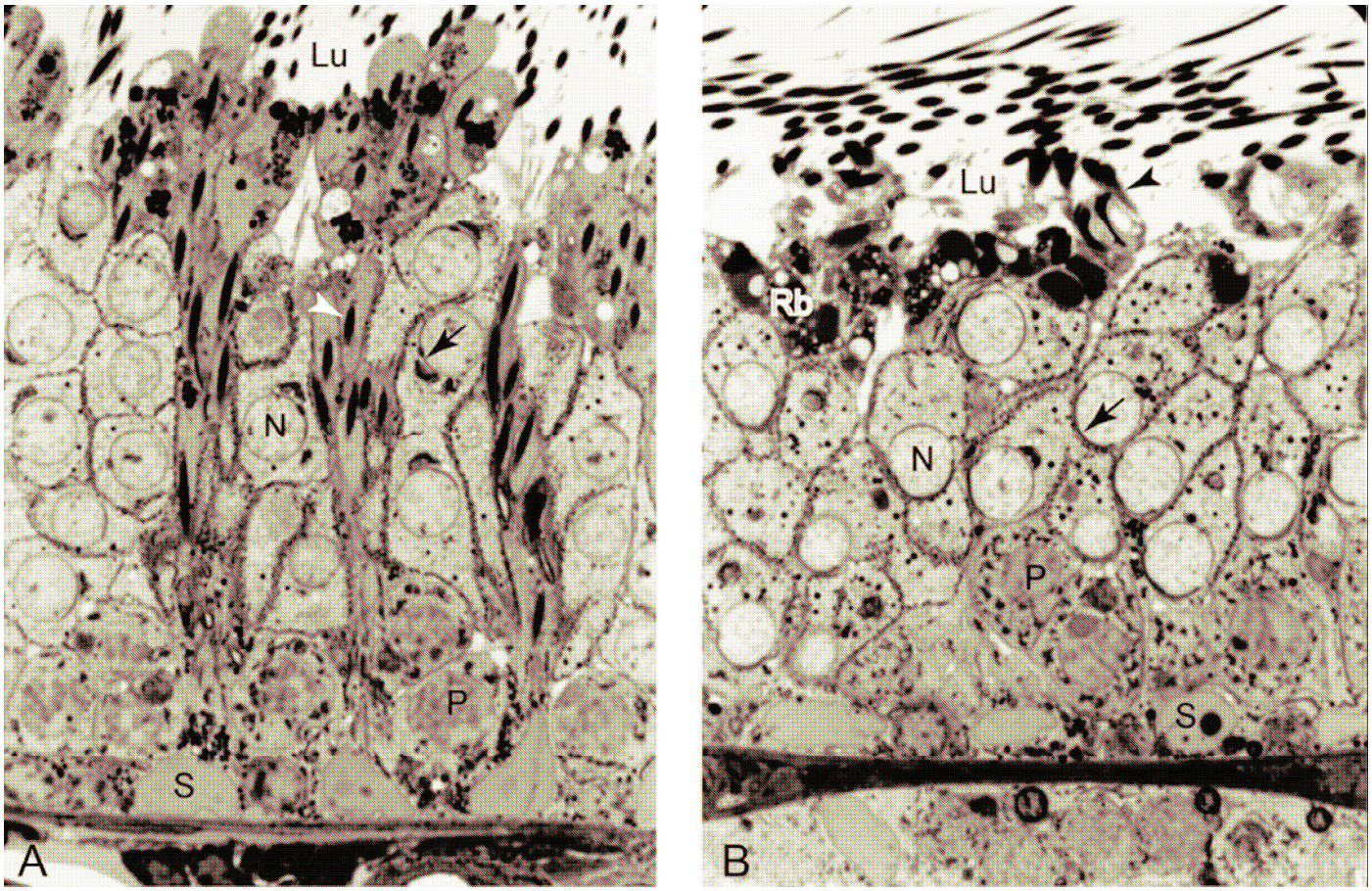


Figure 3: Microscopie optique d'un fragment de tube séminifère de rat au stade IV-V (A) et VIII (B). Sur l'image A, les têtes allongées des spermatides sont toujours enchâssées dans l'épithélium. En B, la majorité des spermatides allongées ont quitté l'épithélium. Quelques unes sont encore visibles au bord de la lumière où beaucoup de corps résiduels (Rb) sont aussi présents.

S : Cellule de Sertoli

P : Spermatocyte au stade pachytène

D'après Hermo et coll. 2010.

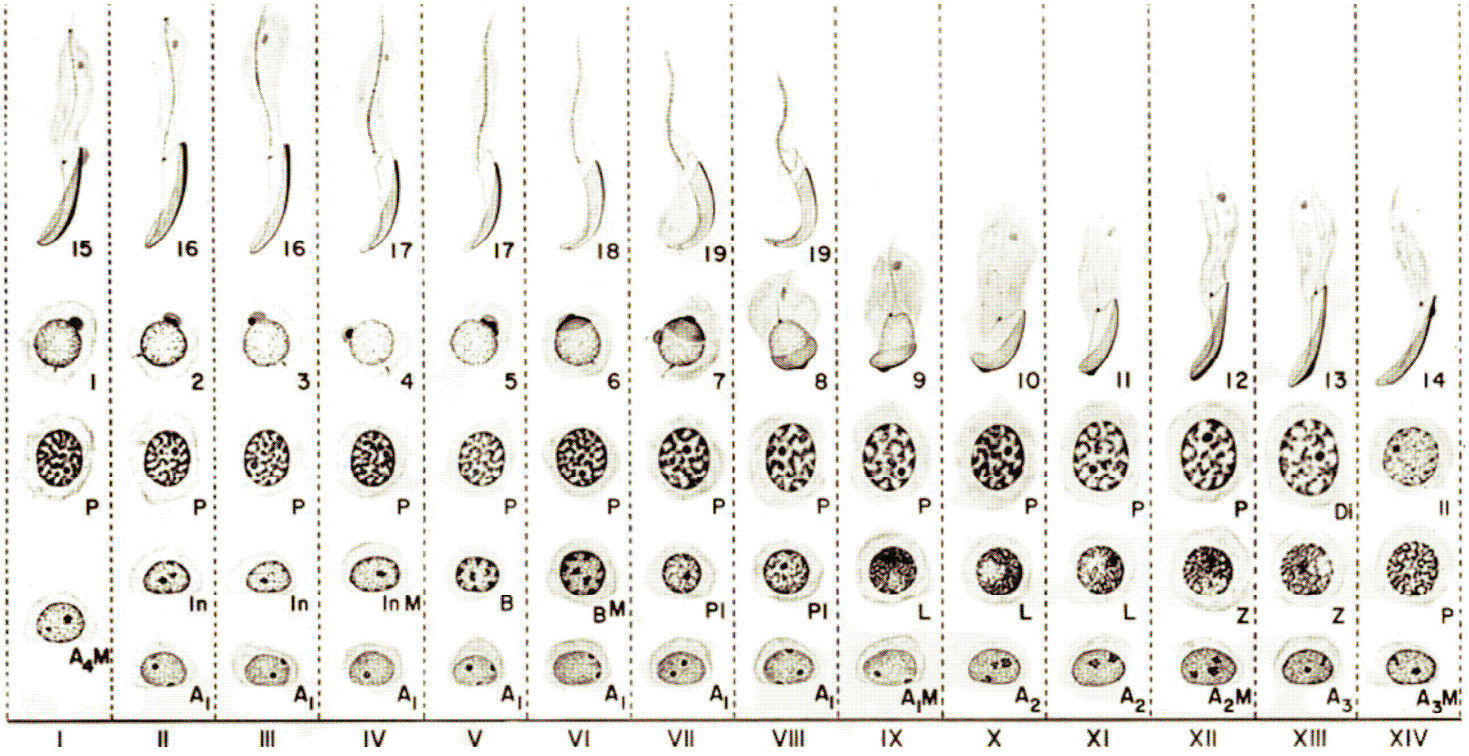


Figure 4: Diagramme des différents stades du cycle de l'épithélium séminifère chez le rat. Les stades sont notés par des chiffres romains de I à XIV. Les colonnes verticales illustrent les différents types cellulaires retrouvés à chaque stade. Les cellules représentées sont légendées spermatogonies A , In (intermédiaire) et B ; spermatocytes Pl (préleptotène), L (leptotène), Z (zygotène), P (pachytène) et D (diplotène) et spermatides des stades 1 à 19 de la spermiogenèse. La lettre «M» indique que ces spermatogonies réalisent des mitoses alors qu'ensuite ce sont des divisions méiotiques.

D'après Dym et Clermont. 1970

4- La cellule de Sertoli

Généralités - Structure

La cellule de Sertoli est une grande cellule pyramidale qui s'étend sur toute la hauteur de l'épithélium séminifère (fig 5). Sa forme, son volume et sa fonction varient au cours du cycle de l'épithélium séminifère, montrant la plasticité de cette cellule synchronisée avec l'évolution des cellules germinales. Le cytosquelette de la cellule de Sertoli est responsable du maintien de la forme cellulaire et des mouvements actifs du cytoplasme nécessaires au déplacement des cellules germinales. Le déclenchement de la spermatogenèse à la puberté n'est possible que si les cellules de Sertoli sont différenciées, et toutes leurs activités sont impliquées dans le déroulement et la régulation de la fonction gamétogénétique (Clermont 1993 ; Jegou 1992). Le corps cellulaire de la cellule de Sertoli repose sur la lame basale de la gaine péritubulaire. Ses faces latérales sont en contact étroit avec les cellules de Sertoli adjacentes et avec les cellules germinales aux divers stades de la spermatogenèse. Elle fournit à la fois l'architecture et le support nutritionnel nécessaire au bon déroulement de la différenciation et de la maturation des cellules germinales (Griswold. 1993) qu'elle protège en participant à formation de la barrière hémo-testiculaire. Chaque cellule de Sertoli supporte 30 à 40 cellules germinales à différents stades de différenciation (Weber et coll. 1983)

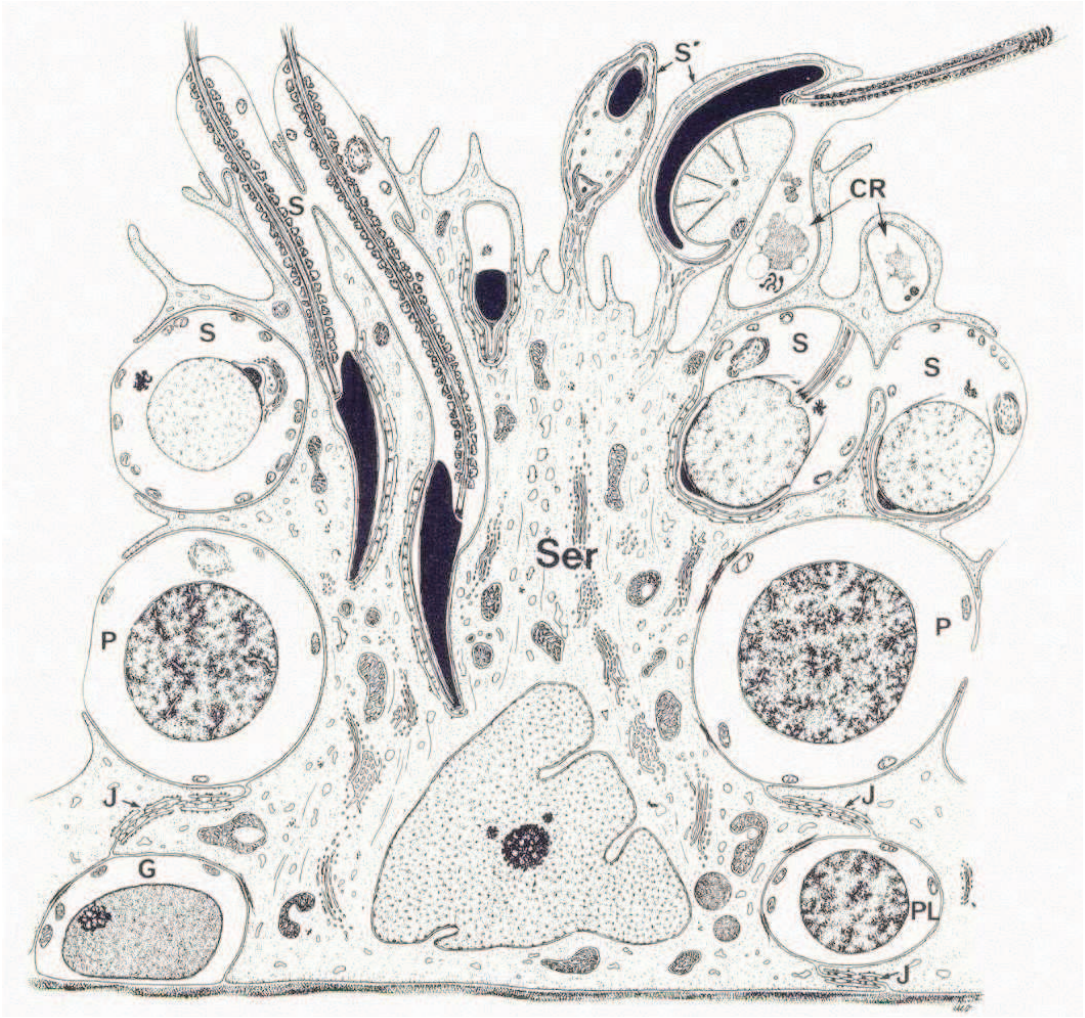


Figure 5:

Relation d'une cellule de Sertoli (Ser) avec diverses cellules germinales de l'épithélium séminifère du rat. Spermatogonie (G), spermatocytes préleptotène (PL) et pachytène (P), spermatides à différentes étapes de la spermiogenèse (S) avec en haut à droite des spermatozoïdes (S') sur le point d'être relâchés dans la lumière du tube ; corps résiduels (CR). J = complexes de jonction entre les cellules de Sertoli adjacentes, composants essentiels de la barrière hémato-testiculaire.

d'après « Médecine de la reproduction masculine », 1984, P Mauvais-Jarvis, Flammarion Médecine/sciences, université de Montréal

Les jonctions cellulaires

La spermatogenèse est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophysaire et la cellule de Sertoli possède des récepteurs pour les principales gonadotrophines : LH et la FSH. Cependant, il est aujourd'hui clairement démontré que les jonctions intercellulaires Sertoli-Sertoli ou Sertoli-cellules germinales sont essentielles au bon déroulement de la spermatogenèse (Mruk et Cheng. 2004 ; pour revue, Kopera et coll. 2010). Les différents types de jonctions intercellulaires sont actuellement bien décrits et leurs composants protéiques ont été en grande partie identifiés. (Cheng et Mruk. 2002, Pointis et coll. 2005, Lui et Cheng. 2007). Il existe 3 grands types de jonctions (fig 6):

- **Les jonctions serrées** (tight junction = TJ), uniquement présentes au niveau de la barrière hémo-testiculaire.
- **Les jonctions d'ancrage** (anchoring junction), présentes entre les cellules de Sertoli, entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales et entre les cellules de Sertoli et la membrane basale. Cela regroupe les jonctions adhérentes, les spécialisations ectoplasmiques basales et apicales, les jonctions desmosome-like, les hémi-desmosomes, les complexes tubulobulbaires.
- **Les GAP jonctions,** qui sont des jonctions communicantes d'ores et déjà connues pour leur implication dans les mécanismes de synchronisation cellulaire, de prolifération, de différenciation, d'apoptose et de coordination métabolique des organes avasculaires (Vinken et coll. 2006)

Ces dernières années, des études fonctionnelles menées sur des modèles murins knock-out, ont permis de découvrir point par point les fonctions de plusieurs de ces composants protéiques (fig 7).

Types de jonctions	Composants protéiques
Jonctions occlusives	
Jonctions serrées entre cellules de Sertoli	**Protéines trans-membranaires** : occludin; occludin-1B; claudins (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12–24); JAM-A, -B and -C; CAR; CLMP; CRB1
	Protéines périphériques : ZO-1, -2, -3; cingulin α- and F-actin; AF-6; PTEN; JEAP; ZA-1 TJ; 7H6 antigen; fodrin
	Protéines de signal : PKC-α; c-src; symplekin; AIP4/Itch; ASIP/Par3; PKC-ζ; ZAK; ZONAB; c-yes; Gα 19B1
	Protéines d'échange : rab13; rab3b; cdc42; Sec6/8; VAP-33
Jonctions d'ancrage avec attachement par l'actine	
Jonctions adhérentes entre cellules de Sertoli et Sertoli et cellules germinales	**Protéines trans-membranaires :** nectin-1, -2, -3 and -4; N-, E-, and P-cadherins; vezatin
	Protéines périphériques: I-afadin; ponsin; α-, β-, and γ-catenins; $p120^{ctn}$; vinculin; α-actinin; myosin VIIa; ZO-1; α- and F-actin; LIN-7; zyxin; axin; WASP; c-Src; p130 Cas; rab8B; rhoB
Spécialisations ectoplasmiques entre cellules de Sertoli et Sertoli et cellules germinales	IQGAP1; cdc42; FAK
Complexes tubulobulbaires entre cellules de Sertoli et Sertoli et cellules germinales	MN7; cofilin; actin; dynamin III; PKCα
Jonctions d'ancrage avec attachement par des filaments intermédiaires	
Desmosomes entre cellules de Sertoli et Sertoli et cellules germinales	plakoglobin; plakophilin; vimentin; desmogelin-1,-2, and -3; desmocollin-1, -2, and -3; desmoplakins
Hemidesmosomes entre cellules testiculaires et matrice extra-cellulaire	integrin; paxillin; desmoplakin-like protein
Jonctions communicantes	
Gap jonctions entre cellules de Sertoli, cellules germinales, et cellules de Leydig	connexines (26, 31, 31.1, 32, 33, 36, 37, 40, 43, 45, 46, 50, 57)

Figure 6 : Constituants protéiques des différents types de jonctions cellulaires dans l'épithélium séminifère. Traduit en français d'après Lui et Cheng. 2007

Proteine de jonction	Fonction reproductive des souris male KO pour la protéine	Modifications phénotypiques majeures	Reference
Occludin	Infertile	Déficit en cellules germinales. Seules les cellules de Sertoli sont retrouvées dans l'épithélium.	Saitou et coll., 2000
Claudin-11	Infertile	Tubules remplis d'aggrégats de cellules nucléolées.	Gow et coll. 1999
JAM-A	Fertile	Pas de modification majeure	Cooke et coll. 2006
JAM-B	Fertile	Pas de modification majeure	Gliki et coll. 2004
JAM-C	Infertile	Taille des testicules diminuée de moitié, pas de différenciation en spermatides allongées, azoospermie	Sakaguchi et coll. 2006
Nectin-2	Infertile	Absence de F-actin au niveau des spermatides allongées, noyaux des spermatides aux stades 11 à 16 déformés	Ozaki-Kuroda et coll. 2002
Connexin43*	Infertile	Présence uniquement des cellules de Sertoli et d'une prolifération active des spermatogonies précoces	Sridharan et coll. 2007

Figure 7 : Phénotype de souris males porteuses de délétions des protéines de jonctions transmembranaires cibles. Traduit en français d'après Lui et Cheng. 2007

La barrière hémo-testiculaire

Chaque cellule de Sertoli est connectée aux cellules adjacentes par des jonctions serrées disposées au pôle basal des cellules. Ainsi deux compartiments sont délimités dans les tubes séminifères :

- Un **compartiment basal**, périphérique contenant les spermatogonies et les spermatocytes préleptotènes.
- Un compartiment central, adjacent à la lumière, le **compartiment ad luminal**, qui contient tous les stades ultérieurs de la lignée germinale.

Les jonctions serrées situées au pôle basal des cellules de Sertoli constituent la composante essentielle de la **barrière hémo-testiculaire (BHT)**. Cette BHT confère une polarité à la cellule de Sertoli, régule le passage de l'eau, des électrolytes, des nutriments et joue un rôle de barrière immunologique. D'autres structures sont également impliquées dans la constitution de la BHT : l'endothélium des capillaires sanguins et les cellules myoïdes de la membrane propre du tube séminifère. L'entrée des ions à travers la BHT est lente et contrôlée par les cellules de Sertoli. (Byers et Pelletier. 1992; Byers et coll. 1993)

La BHT subit des modifications structurales au cours de la méiose (Cheng et Mruk. 2002; Yan et coll. 2008). Les spermatocytes préleptotène vont entrer en méiose en se différenciant en spermatocytes leptotène. A ce moment là, ils quittent le compartiment basal pour rejoindre progressivement le compartiment ad-luminal duquel ils sont encore séparés par des jonctions internes. Vers la fin du stade leptotène, une 2ème série de jonctions se forme du côté basal (jonctions externes) des spermatocytes pachytène de telle sorte que ces cellules sont situées dans un compartiment intermédiaire. Les jonctions internes s'ouvrent pour libérer les cellules au stade diplotène dans le compartiment ad-luminal (Mruk et Cheng. 2004).

La BHT assure la régulation du transport des hormones. Elle permet la diffusion facilitée de la testostérone, elle régule les mouvements d'hormones peptidiques comme

l'inhibine et les gondotrophines. Elle assure le maintien d'une concentration élevée d'inhibine dans les tubes séminifères alors qu'elle exclut totalement FSH et LH du liquide tubulaire (Setchell. 2008)

Rôle immunitaire de la BHT. La BHT joue un rôle fondamental dans la protection des cellules situées dans le compartiment ad-luminal, en particulier en les isolant de la circulation et donc en les protégeant des cellules immunocompétentes. Elle empêche la reconnaissance par le système immunitaire de l'organisme des protéines spécifiques de surface qui se trouvent sur les cellules germinales dès le stade pachytène en interdisant leur diffusion. Toutefois il semble que la prévention de la réponse auto-immune testiculaire soit assurée par le système immunitaire systémique ou local, indépendamment de la BHT (Setchell. 1978, Fijak et Meinhardt. 2006).

Régulation dynamique des jonctions cellulaires

La cellule de Sertoli présente des modifications morphologiques et biochimiques en rapport avec le cycle de l'épithélium séminifère (Godet et coll. 2008).

D'une part, **il existe une variation cyclique des organites cellulaires et de la production de protéines** telles que l'ABP, la transferrine, et l'activateur du plasminogène (Griswold. 1993). Le débit de cette dernière protéine s'élève lors du passage des spermatocytes leptotènes dans le compartiment juxtaluminal, et suggère ainsi une utilisation potentielle de ces propriétés protéolytiques. L'hormone antimüllérienne (AMH) est elle aussi sécrétée par la cellule de Sertoli. Son débit dans le testicule adulte est faible, son rôle essentiel étant rempli au cours de la vie embryonnaire et fœtale.

D'autre part, **il existe une régulation dynamique des différents types de jonctions cellulaires permettant une restructuration permanente de l'épithélium séminifère** au cours des cycles de spermatogenèse. Jusqu'à la libération des spermatides allongées dans la lumière des tubes séminifères, les cellules germinales aux différents stades de leur

développement restent étroitement liées aux cellules de Sertoli. Les jonctions formées entre cellules de Sertoli et entre cellules de Sertoli et cellules germinales doivent donc être continuellement restructurées pour s'adapter à l'avancée et aux transformations morphologiques des cellules germinales durant leur développement. Les signaux de régulation empruntent de multiples voies impliquant des protéines kinases, des petites GTPases, des protéases et des inhibiteurs de protéases (Mruk et Cheng. 2004). Dans ces cascades de transduction du signal, **les cytokines**, en particulier **TGFβ3** (Transforming Growth Factor) et **TNFα** (Tumor Necrosis Factor) jouent un rôle clé de régulation (Li et coll. 2009). Chez le rat, la restructuration majeure de ces jonctions se produit durant le stade VIII du cycle de l'épithélium séminifère et ces 2 cytokines sont retrouvées à des taux très élevés dans le micro-environnement testiculaire à ce stade (Li et coll. 2006; Xia et coll. 2009). **L'interleukine 1α** semble elle aussi impliquée dans cette régulation. Sécrétée par les spermatocytes I et les cellules de Sertoli, il a récemment été montré qu'elle augmentait la perméabilité de la BHT lorsqu'elle était administrée chez le rat adulte (Sarkar et coll. 2008) en agissant sur le cytosquelette d'actine.

Ces cytokines agissent de concert avec **la testostérone** en régulant les phénomènes d'endocytose et de recyclage des protéines membraines de la BHT (Yan et coll. 2008). Les cytokines agissent à la fois sur la production de testostérone (Warren et coll. 1990; Bornstein et coll. 2004) et sur l'expression du récepteur aux androgènes dans le testicule (Delfino et coll. 2003)

Pour synchroniser cette restructuration de la BHT, il doit exister des systèmes de communication intercellulaire entre cellules germinales et cellules de Sertoli qui s'ajoutent à la régulation paracrine des cytokines. La communication entre cellules germinales au même stade peut se faire par les ponts cytoplasmiques intercellulaires. La communication entre cellules germinales et cellules de Sertoli est possible grâce aux GAP jonctions, dont les

composants essentiels sont les connexines (pour revue, Pointis et coll. 2010). Ces GAP jonctions permettent le passage entre 2 cellules voisines de molécules de taille < 1,2 kDa dont le cAMP et l'ATP (Mese et coll. 2007, Harris. 2007). La connexine 43 et le PKP2 (Desmosomal Adaptator Protein Plakophilin 2), composants testiculaires de ces GAP jonctions, agissent ensemble pour réguler la restructuration dynamique de la BHT. En 2009, Gilleron et coll. ont montré que dans le testicule, la connexine 43 participait au contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli et était indirectement impliquée dans le nombre de cellules germinales obtenues en contrôlant leur taux de survie et d'apoptose.

5- Régulation neuro-endocrine de la spermatogenèse

La spermatogenèse est soumise à un contrôle hormonal complexe, à plusieurs étages, hypothalamo-hypophyso-testiculaire (fig 8)

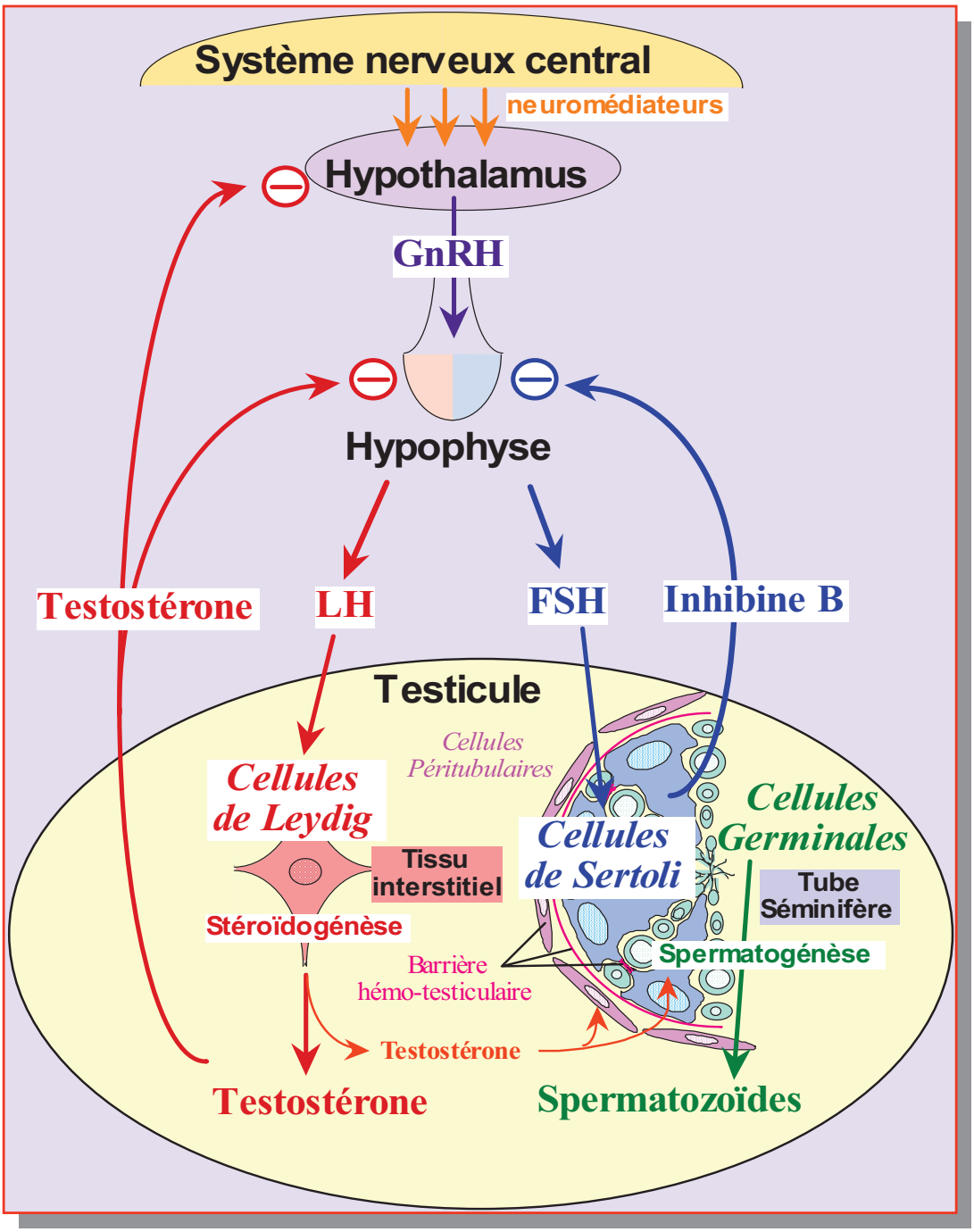


Figure 8: Régulation endocrine de la spermatogenèse

a- Le niveau hypothalamique

Les neurones des noyaux supra-optique et ventro-médian de l'hypothalamus synthétisent une gonadolibérine, **le GnRH (**Gonadotrophine Releasing Hormone), qui est secrétée de façon discontinue, par décharges ou "pulses".

b- Le niveau hypophysaire

Le GnRH a des récepteurs sur les cellules de l'antehypophyse et y induit la synthèse de deux hormones gonadotropes ou gonadotrophines, la **FSH** et la **LH** qui sont secrétées de manière pulsatile. Elles ont comme cellules cibles les cellules du testicule. Une 3ème hormone est sécrétée à ce niveau, la prolactine.

Les rôles de la FSH et de la LH

La FSH est indispensable au démarrage de la spermatogenèse chez le rat impubère. Chez l'adulte, elle joue un rôle plus ou moins important dans le maintien de la spermatogenèse. Chez le rat hypophysectomisé, la spermatogenèse peut être maintenue par l'injection de testostérone seule à condition d'avoir un concentration aussi élevée que celle du rat normal au niveau du testicule (Santulli et coll. 1990) mais le rendement de la spermatogenèse est inférieur à celui obtenu par injection de FSH et LH. Chez le rat adulte, la FSH et la testostérone ont une action positive et synergique sur les deux divisions méiotiques (Vigier et coll. 2004).

Le rôle de la prolactine

La prolactine (PRL) intervient sur la fonction de reproduction à la fois par une action centrale et directement sur le testicule. Chez le rat, le récepteur de la PRL est exprimé dans le tissu interstitiel, à la surface des cellules de leydig, sur les cellules de Sertoli et sur toutes les

cellules de la lignée germinale, à l'exception des spermatides rondes. L'administration de la PRL à des rats hypophysectomisés recevant de la LH améliore la spermatogenèse. La PRL joue un rôle favorable sur la stéroidogenèse, elle augmente le nombre de récepteurs Leydigiens de la LH et stimule la fixation de LH sur ces récepteurs. Il s'ensuit une augmentation de la synthèse et sécrétion de la testostérone.

c- Le niveau testiculaire

Effets des hormones gonadotropes

La **cellule de Sertoli** possède des récepteurs à la FSH qui induit la synthèse par cette cellule d'hormones et de facteurs protéiques : l'ABP (Androgen Binding Protein), l'inhibine, un facteur mitogène, le SGF (Seminiferous Growth factor), l'IGF 1 (Insulin Growth factor), un activateur du plasminogène et l'hormone antimüllérienne (AMH).

La **cellule de Leydig** possède des récepteurs à la LH qui induit la synthèse de la testostérone, de l'ocytocine et de la vasopressine par cette cellule.

Les effets des sécrétions testiculaires

Les **androgènes** ont une action au niveau hypothalamique où ils exercent une action inhibitrice sur la libération de GnRH. Ils ont aussi une action au niveau hypophysaire où ils inhibent la libération de la FSH et de la LH. Le rétrocontrôle de la LH est du aux stéroïdes leydigiens, celui de la FSH résulte en partie de l'action de l'inhibine. Enfin, les androgènes stimulent les différentes phases de la spermatogenèse et agisent au niveau de l'épididyme pour la maturation et l'aquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Le **SGF** stimule les mitoses spermatogoniales. L'**IGF1** stimule la maturation des spermatocytes. L'**activateur du plasminogène** synthétisé par la cellule de Sertoli permet la résorption des corps résiduels au cours de la spermiogenèse. L'**ocytocine** et la **vasopressine** stimulent les contractions des

cellules myoïdes des tubes séminifères et des cellules de sertoli au cours de la spermiation. Le **relaxin-like-factor** (RLF) est un produit peptidique très abondant dans les cellules de Leydig. Son rôle est incertain mais la délétion du gène qui code pour ce facteur est responsable d'une défaillance de la spermatogenèse.

Rôle des oestrogènes: un nouvel acteur dans la spermatogenèse (Carreau et coll. 2007)

Chez les mammifères, la balance entre androgènes et oestrogènes est essentielle au développement sexuel normal et à la reproduction. Dans le testicule, cet équilibre est finement contrôlé par des facteurs endocrines et paracrines, mais aussi par l'activité de l'aromatase. L'aromatase, codée par le gène *cyp*19, est une enzyme, exprimée dans le testicule, qui permet la transformation des androgènes en oestrogènes. Elle est composée de 2 protéines: la NADPH-cytochrome P450 reductase, ubiquitaire, et la cytochrome P450 aromatase, spécifique. Son expression dans le testicule est dépendante de l'âge: chez le rat, elle est ainsi très présente au niveau des cellules de Sertoli chez les animaux jeunes alors qu'à l'âge adule, elle est majoritairement exprimée par les cellules de Leydig. (Carreau et coll. 1999). Elle est aussi présente au niveau des cellules germinales (Hess et coll. 2004). Enfin, l'aromatase a été mise en évidence par Western Blot dans les cellules germinales immatures et dans les spermatozoïdes éjaculés (Carreau et coll. 2007).

Il est aujourd'hui établi que les oestrogènes testiculaires, via leurs récepteurs ERα et ERβ, jouent un rôle dans la maturation des cellules germinales au cours de la spermatogenèse (Aquila et coll. 2004 ; Aschim et coll. 2004). Ils semblent aussi agir sur les spermatozoïdes éjaculés en participant à la régulation de leur mobilité et de leur pouvoir fécondant (Carreau et coll. 2007). (fig 9)

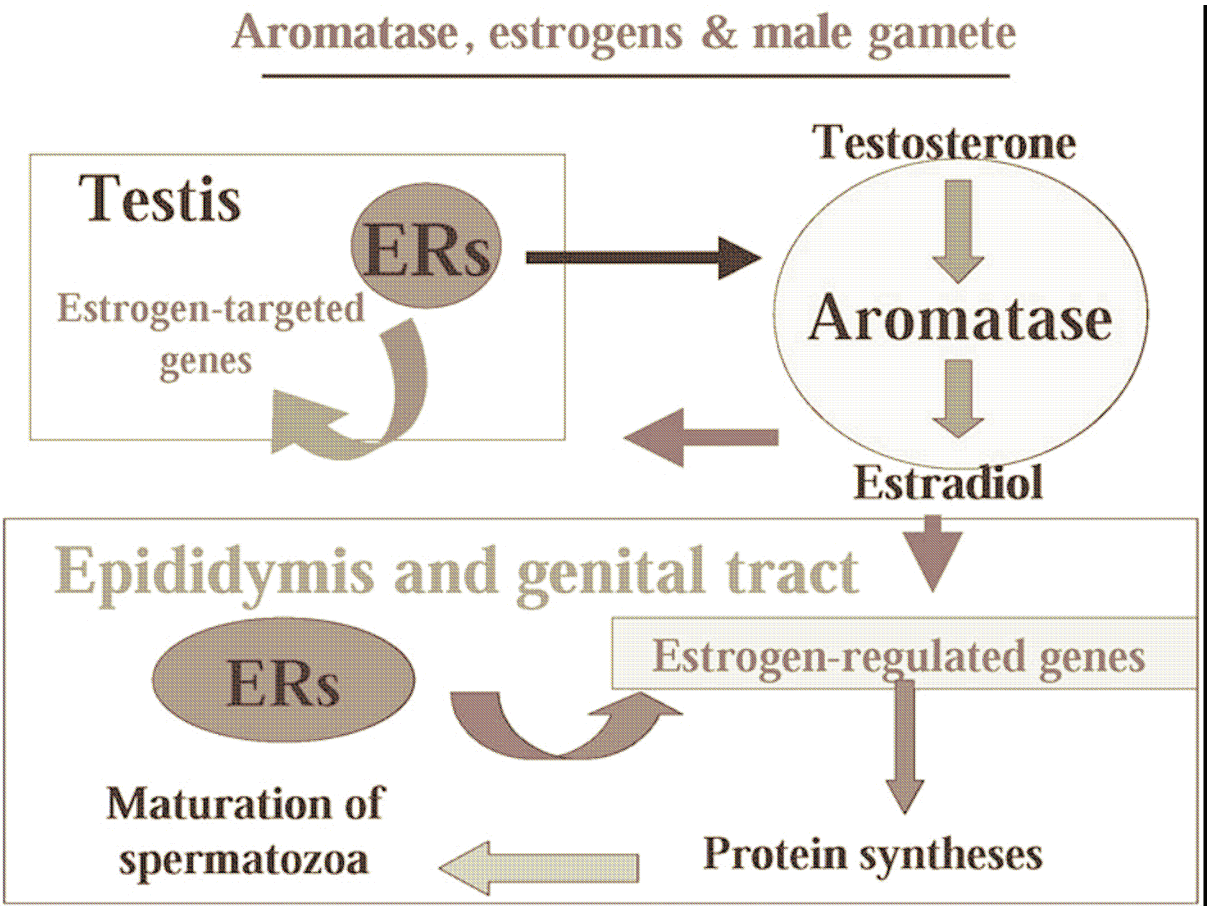


Figure 9: Rôles possibles des oestrogènes dans le tractus génital masculin, d'après Carreau et coll. 2007

6- Régulation thermique de la spermatogenèse

Le maintien du testicule et de l'épididyme à une température inférieure à celle du corps (de 4 à 6°C) est indispensable chez les mammifères exorchides pour que la méiose s'effectue et que les spermatozoïdes se conservent correctement (Mieusset et Bujan. 1995 ; Mariotti et coll. 2010). La constance d'une température basse dans le testicule quelle que soit la température extérieure résulte de:

- La présence d'un échangeur thermique, l'ensemble artère-plexus veineux pampiniforme, qui constitue un système d'échange de chaleur à contre-courant ayant pour effet d'abaisser le température du sang artériel testiculaire.
- La contraction ou la relaxation.du crémaster qui peut ramener ou non le testicule contre l'abdomen. La contraction du crémaster est observée in vitro quand le milieu d'incubation est refroidi et vice versa, ce qui implique la présence de thermorécepteurs internes.
- La contraction ou la relaxation de la tunique musculaire du scrotum qui réduit ou augmente la surface scrotale donc l'échange thermique avec l'air (Sawasakia et coll. 2001).
- La réaction générale de l'animal suscitée par les récepteurs cutanés scrotaux.

Plusieurs circonstances peuvent se traduire par une augmentation de la température testiculaire et épididymaire. Ces circonstances peuvent être endogènes comme par exemple la cryptorchidie, le varicocèle, un trouble du système de thermorégulation ou exogènes comme l'exposition porfessionelle à une source de chaleur ou certaines conditions (position assise, conduite prolongée...). La conséquence sur la spermatogenèse et la maturation épididymaire sera fonction de l'intensité et la durée de l'apport caloriqueainsi que de l'efficacité du système de thermorégulation".

Chez l'homme, la présence d'un varicocèle, définit par une dilatation pathologique du plexus pampiniforme et des veines scrotales avec un reflux sanguin veineux, perturbe cette régulation thermique. Romeo et Santoro (2009), ont montré que le varicocèle était présent chez 15% des hommes dans la population générale alors qu'il était retrouvé chez 35% des hommes avec infertilité primaire et chez 80% des hommes avec infertilité secondaire.

Lors d'études expérimentales, les modèles de culture ex-vivo doivent tenir compte de ces impératifs thermiques, adaptés à l'espèce en cause. Les cultures de tubes séminifères de rat utilisées dans ce travail se déroulent en atmosphère contrôlée à 32°C.

II- La méiose: description générale et particularités chez le rat

La méiose est un phénomène unique, très conservé au cours de l'évolution des espèces, caractérisé par la succession de deux divisions cellulaires précédées d'une seule synthèse d'ADN. Elle est propre à la gamétogenèse, au cours de laquelle elle joue un rôle capital en assurant deux événements d'une importance fondamentale pour la reproduction des espèces : la réduction du nombre de chromosomes et le brassage des informations génétiques d'origine maternelle et paternelle. C'est une suite complexe d'événements, qui impliquent un grand nombre de protéines dont certaines sont spécifiques de la méiose alors que d'autres appartiennent aussi au cycle cellulaire mitotique

1- Chronologie des divisions (fig. 10)

a- La première division méiotique

Elle occupe à elle-seule la presque totalité du temps de la méiose. La longueur de cette étape est liée au fait que s'y déroulent la réduction du nombre de chromosomes et le brassage de l'information génétique.

A la fin de la phase de multiplication des spermatogonies, les spermatocytes I nouvellement formés restent pendant une certaine période en intercinèse pour réaliser la dernière synthèse d'ADN qui précède la méiose : c'est le stade préleptotène. A la fin de ce stade, la cellule possède 2n chromosomes chacun à deux chromatides. La cellule entre alors en méiose.

❖ *La Prophase I*

Elle est caractéristique par sa longueur, qui représente 90% du temps total de la méiose, et par sa subdivision en 5 stades, définis par les différents aspects chromosomiques observés au cours de cette étape :

- Au cours du stade leptotène, les chromosomes s'individualisent sous forme de longs filaments attachés par leurs extrémités à la membrane nucléaire. Lors de ce stade, la recherche de l'homologie permettra des appariements « gène à gène » des chromosomes. C'est un stade particulièrement fugace chez le rat.

- Le stade zygotène est caractérisé par le début des appariements chromosomiques ou synapsis (Zickler et Kleckner. 1998). Chez le rat, la progression se fait de façon très asynchrone entre les différents bivalents. Le stade zygotène est caractérisé par son hétérogénéité, certains chromosomes étant déjà totalement appariés quand d'autres commencent à peine leur appariement. L'appariement semble commencer par les petits chromosomes métacentriques, les grands acrocentriques s'apparient secondairement (Sherthan et Schonborn. 2001).

- Le stade pachytène est marqué par l'achèvement du synapsis. Les chromosomes sont appariés constituant chez le rat 21 bivalents ou tétrades. Dans chaque spermatocyte I on distingue 20 bivalents autosomiques et un bivalent sexuel condensé sous forme hétérochromatique : le corps XY.

- Au stade Diplotène, les bivalents se dissocient par séparation des chromosomes homologues. Ceux-ci restent toutefois attachés les uns au autres en des points précis préférentiellement localisés chez le rat au niveau des extrémités télomériques. Ce sont les chiasmas, chacun étant la traduction cytologique de la réalisation d'un crossing-over.

- la Diacinèse est une étape de transition entre le diplotène et la métaphase I, elle marque la fin de la prophase de la première division méiotique. Au cours de cette phase, les

chromosomes se condensent et se détachent de l'enveloppe nucléaire qui commence à disparaître.

- *La métaphase I*

Lors de la métaphase I, les bivalents se disposent au niveau de la plaque équatoriale et sont attachés aux fibres du fuseau par leurs kinétochores. Contrairement à une division mitotique, les centromères et les kinétochores sœurs sont dirigés vers le même pôle du fuseau permettant la séparation des chromosomes homologues au stade suivant.

- *L'anaphase I*

Elle débute avec la rupture des chiasmas, les chromosomes homologues se séparent. Ce sont des chromosomes ayant chacun 2 chromatides qui migrent aux pôles opposés du fuseau.

- *La Télophase I*

Elle marque la fin de la première division méiotique. Les membranes nucléaires se reforment alors autour des 2 lots chromosomiques.

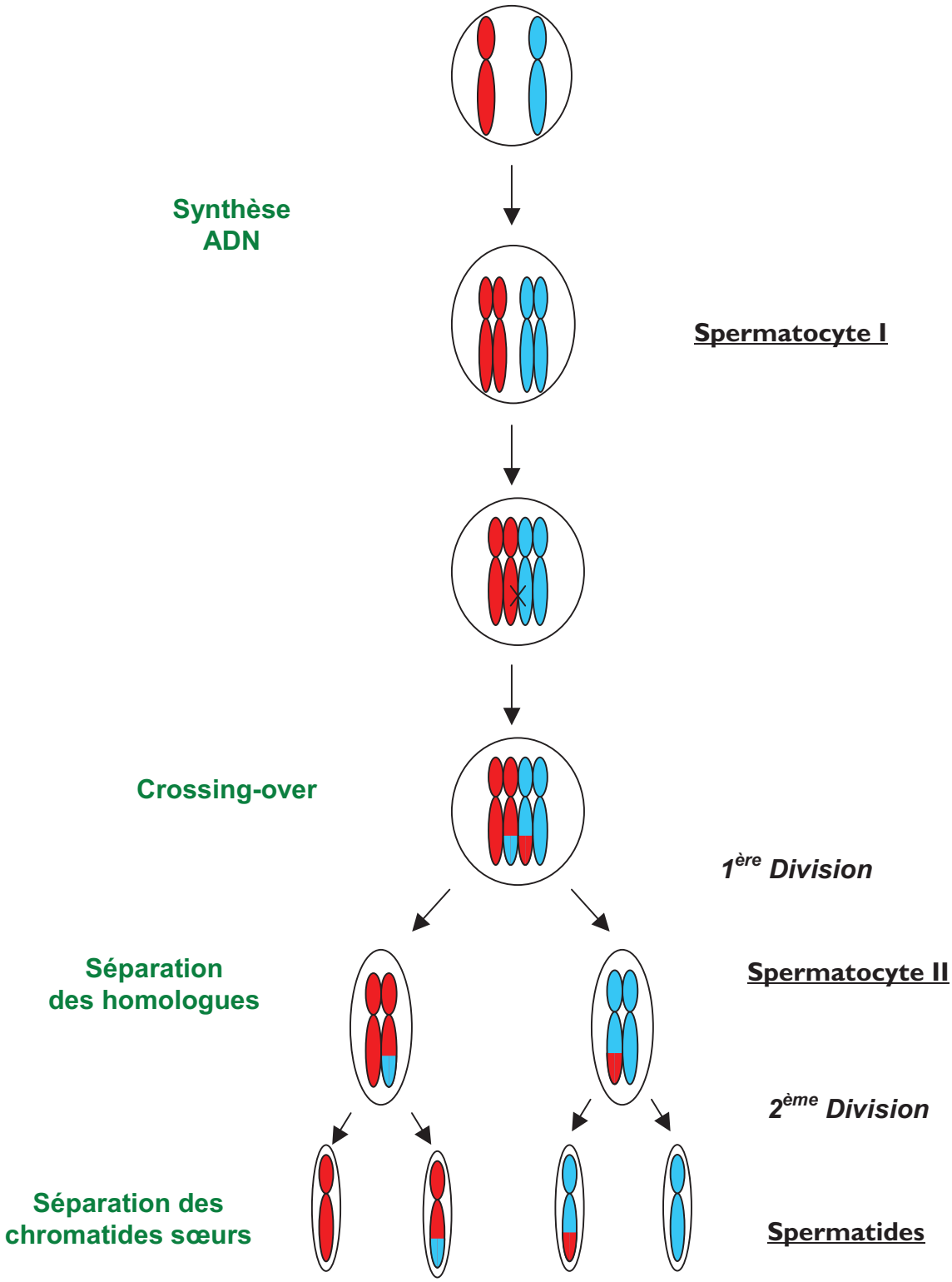
La cellule se divise en deux cellules filles selon un mécanisme appelé cytodiérèse, chacune de ces cellules emporte un lot haploïde de chromosomes formés chacun de 2 chromatides.

b- La deuxième division méiotique

Elle ressemble à une mitose dont elle se distingue à la fois par le fait qu'elle se déroule sur des cellules haploïdes et parce qu'elle n'est pas précédée par une synthèse d'ADN. Les centromères et les kinétochores sœurs ont la même disposition que lors d'une mitose, ils sont dirigés vers les pôles opposés du fuseau. Le clivage des centromères à l'anaphase II permet la séparation des chromatides sœurs, et à la fin de la méiose, chaque cellule germinale contient

21 chromosomes possédant chacun une seule chromatide. La cellule est maintenant une cellule haploïde vraie ne contenant qu'un seul exemplaire de chaque gène. La première division méiotique est classiquement qualifiée de division « réductionnelle » car elle donne naissance à 2 cellules filles qui ne possèdent chacune que 21 chromosomes. La seconde division méiotique est classiquement qualifiée d'« équationnelle » car le nombre de chromosomes est le même dans la cellule mère et dans les 2 cellules filles. En réalité, le nombre de molécules d'ADN est bien divisé par deux dans les cellules filles : 2C dans le spermatocyte II, 1C dans chaque spermatide.

Figure 10: Schéma général de la méiose



2- Les grands évènements de la méiose

C'est au cours de la première division que se déroulent les grands évènements de la méiose.

a- Cohésion des chromatides sœurs

La cohésion des chromatides sœurs est contemporaine de la réplication de l'ADN qui correspond au stade pré-leptotène de la prophase I de la méiose. A la fin de cette phase les deux chromatides sœurs sont étroitement associées par leurs bras et par leurs centromères, elles restent cohésives jusqu'à la transition métaphase I - anaphase I. Dès le début de l'anaphase I, les bras des chromosomes se séparent et les chromatides ne sont plus reliées que par leurs centromères qui restent cohésifs jusqu'à la transition métaphase II - anaphase II. Le clivage des centromères se fait au démarrage de l'anaphase II, il entraîne une séparation complète des chromatides sœurs qui migrent dans les deux cellules filles.

Bien que des modifications dans la topologie de l'ADN soient nécessaires pour la séparation des chromosomes, chez les eucaryotes, ce sont les cohésines qui jouent un rôle prépondérant dans la cohésion des chromatides sœurs. Ces protéines, appartenant à la famille des ATPases chromosomiques, peuvent être communes aux cycles cellulaires mitotiques et méiotiques, ou spécifiques à la méiose (Prieto et coll. 2004). Elles interviennent dans la cohésion des chromatides sœurs par des mécanismes de phosphorylation encore mal compris. C'est la disparition de ces protéines au niveau des bras chromosomiques à la transition métaphase I-anaphase I qui entraîne la séparation des bras chromatidiens lors de la première division, et au niveau des centromères à la transition métaphase II-anaphase II qui permet la séparation complète des chromatides soeurs à la fin de la deuxième division.

Deux classes de cohésines ont été décrites chez la levure : les SMC (Structural Maintenance Proteins) et les SCC (Sister Chromatid Cohesion). Plusieurs familles de protéines existent au

sein de chacune de ces classes. Les cohésines ont plusieurs fonctions au cours de la méiose, elles interviennent dans la ségrégation chromosomique, dans la réparation de l'ADN au cours de la recombinaison génétique, et contribuent à l'assemblage des complexes synaptonémaux en participant à la formation des éléments axiaux. Un certain nombre de cohésines spécifiques de la méiose ont été identifiées, parmi elles Rec8 variant méiotique de SCC1 et STAG3 variant méiotique de SCC3. En cas de défaillance de ce mécanisme, des anomalies de ségrégation sont susceptibles de survenir, entraînant la formation de gamètes déséquilibrés (trisomies et nullosomies des chromosomes impliqués par ce défaut de cohésion). Lorsque la cohésion des chromatides soeurs est totalement absente, la séparation des deux chromatides avant l'anaphase I (Precocious Separation of Sister Chromatid ou PSSC) peut entraîner la ségrégation d'une chromatide avec l'homologue normal dans une cellule fille, et d'une seule chromatide dans l'autre cellule fille (Angell. 1995; Angell et coll. 1994). Ce type d'anomalie conduit également à la formation de gamètes nullosomiques et trisomiques pour ce chromosome (Guichaoua et coll. 2003).

b- Appariement des chromosomes homologues

Au cours du stade leptotène, apparaît le long de chaque chromosome une structure protéique appelée élément axial sur laquelle sont fixées les boucles de chromatine des deux chromatides sœurs maternelle et paternelle. L'appariement des chromosomes homologues débute au stade zygotène par la mise en place d'une structure protéique, le Complexe Synaptonémal (CS). Celui-ci apparaît en premier aux extrémités des chromosomes puis s'étend progressivement sur toute leur longueur, l'appariement est complet au début du stade pachytène. Le CS est une structure en forme de rail qui a été parfaitement décrite en microscopie électronique conventionnelle. Elle est constituée de 2 éléments latéraux séparés par une distance de 100 nanomètres, formés à partir des éléments axiaux des deux

homologues apparus au leptotène, et reliés à un élément central par des filaments transversaux (Fig.11). On a comparé le phénomène de formation des CS à un mouvement de fermeture-éclair. L'achèvement du synapsis marque le début du stade pachytène. Au cours de ce stade, les chromosomes homologues sont appariés sur toute leur longueur. Le nombre des CS est égal à celui des bivalents c'est à dire n. Les composants moléculaires du CS des mammifères ont été identifiés, permettant la génération d'anticorps contre les protéines des éléments axiaux et latéraux tels que Synaptonemal Complex Protein 2 (SCP2) et 3 (SCP3, aussi appelée Cor 1), et celles des filaments transverses de l'élément central, Synaptonemal Complex Protein 1 (SCP1) (Petronczki et coll. 2003, Hassold et coll. 2000) (Fig 12).

Au stade diplotène, les protéines du CS se dissocient permettant ainsi la séparation des chromosomes homologues qui ne sont plus réunis que par les chiasmas témoins des crossing-over. (Vallente et coll. 2006, Alberts et coll. 2004)

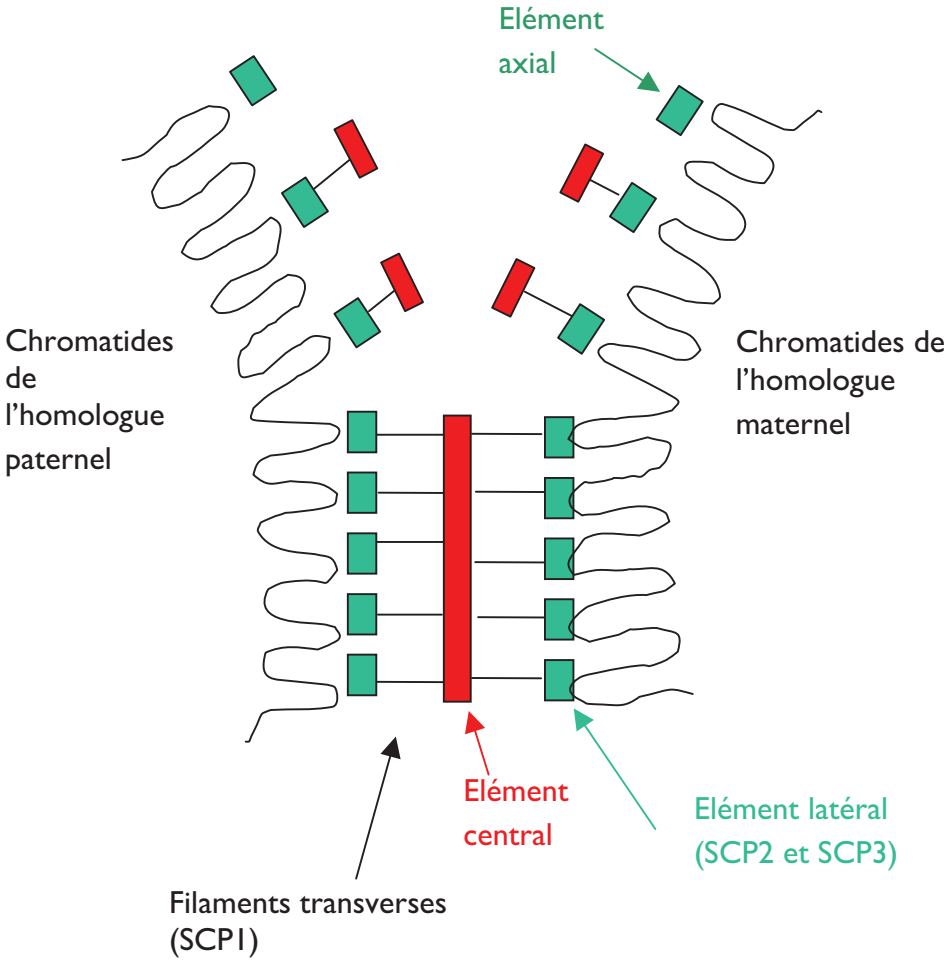


Figure 11: Formation du complexe synaptonémal : L'appariement débute au stade zygotène pour s'achever au stade pachytène. Les éléments axiaux se condensent progressivement pour former les 2 éléments latéraux du CS

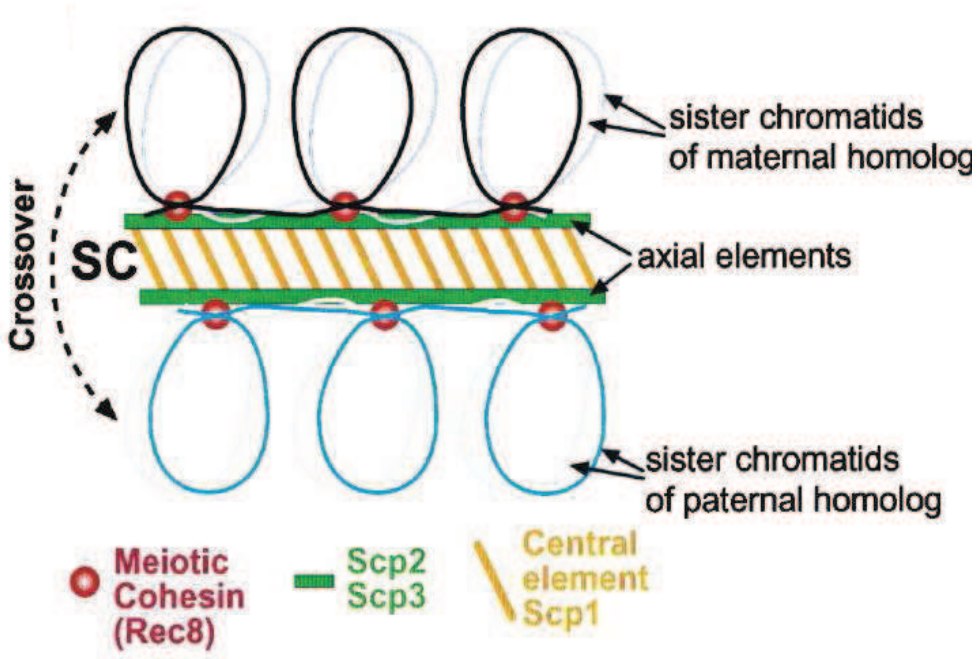


Figure 12: Modèle schématique de l'organisation des protéines du complexe synaptonémal (SC), des cohésines et de la chromatine au stade pachytène. La protéine SCP1 est localisée au niveau de l''élément central (en jaune). Les protéines SCP2 et SCP3 sont situées au niveau des éléments axiaux/latéraux (en vert), qui maintiennent les boucles de chromatine des chromatides sœurs de l'homologue d'origine maternelle ou paternelle. Les chromatides sœurs sont unies par les Cohésines composées notamment de la protéine Rec8 (d'après Petronczki et coll. 2003).

c- Recombinaison génétique et formation des chiasmas

La recombinaison génétique joue un rôle essentiel au cours de la première division méiotique en assurant la diversité du patrimoine génétique dans les gamètes et la ségrégation ordonnée des chromosomes lors de la première division méiotique. Elle est initiée très précocement, dès le début du stade leptotène, par la formation des cassures double brin (CDB) de la molécule d'ADN. La topo isomérase SPO11 est responsable de la formation des CDB de l'ADN, cette action est conservée dans plusieurs espèces de la levure aux mammifères (pour revue, Baudat et Keeney. 2001).

Les événements qui surviennent après l'induction des CDB par SPO11 ne sont pas parfaitement élucidés chez les mammifères, mais ont été entièrement caractérisés dans d'autres espèces comme *Saccharomyces cerevisiae* ou *Caenorhabditis elegans* (Mezard et coll. 1999). La résolution des CDB peut être réalisée selon plusieurs processus (résumés dans la Figure 13), mais les événements de recombinaison sont dirigés par la réparation des CDB impliquant la formation de doubles jonctions de Holliday. Une endonucléase spécifique initie la recombinaison en coupant simultanément les deux brins de la double hélice, créant une coupure complète de la molécule d'ADN (Fig. 13b). La réparation des CDB est assurée par des complexes multi protéiques. Ces protéines peuvent être soit spécifiques de la méiose, soit impliquées également dans la mitose. Dans ces deux mécanismes, l'extrémité 5' de la CDB est dégradée vers l'arrière par une exonucléase, ce qui forme une extrémité 3' saillante sur un seul brin (Fig. 13c). La protéine Rad51, dont le fonctionnement nécessite de multiples protéines accessoires comme Brca1 et Brca2, permet à l'extrémité 3' simple brin (brin invasif) de s'apparier avec une région homologue de la double hélice d'ADN du chromosome homologue (Sung et Robberson. 1995). Une synthèse d'ADN a lieu à partir de l'extrémité 3'

du brin invasif (Fig. 13d), suivie par une capture de la seconde extrémité pour restaurer le brin non invasif (Fig. 13e).

Cet événement conduit à la formation d'une molécule de jonction entre le chromosome maternel et le chromosome paternel, structure à quatre brins appelée double jonction de Holliday. La résolution de la double jonction de Holliday est à l'origine d'une conversion génique, qui peut aboutir (ou non) à la formation de crossing-over visibles sous la forme de chiasmas au stade diplotène (Fig. 13f).

Les chiasmas sont la traduction cytologique des crossing-over. Alors que les événements moléculaires de la recombinaison génétique, dont l'étape ultime est la formation des crossing-over (CO), se déroulent du stade leptotène au stade pachytène, seuls les CO étaient visualisés au stade diplotène et à la métaphase I sous la forme de chiasmas par des techniques d'analyse cytogénétique de la méiose. C'est ainsi que Hulten et coll. (1978) ont pu définir que le nombre de chiasmas par noyau dans l'espèce humaine est de 50 chez l'homme et de 52 chez la femme, cette différence étant liée à l'existence d'un seul chiasma sur le bivalent XY et de deux ou trois sur le bivalent XX. Chez le rat et la souris, le nombre moyen de crossing-over est de 25 par noyaux (Lawrie et coll. 1995). Pour les bivalents autosomiques, le nombre de chiasma par bivalent décroît avec la taille des chromosomes ; c'est ainsi que les grands bivalents peuvent présenter plusieurs chiasmas, jusqu'à quatre dans l'espèce humaine et trois chez le rat alors les petits bivalents n'en ont qu'un seul. Les CO ne sont pas distribués au hasard sur les bivalents, il existe en effet un phénomène d'interférence chiasmatique qui inhibe la survenue d'un chiasma dans le voisinage immédiat d'un autre chiasma. Ce phénomène permet la présence d'au moins un chiasma sur les plus petits bivalents. La présence d'au moins un CO par bivalent est nécessaire à la ségrégation correcte des homologues à l'anaphase I, c'est ce qu'on appelle le CO obligatoire

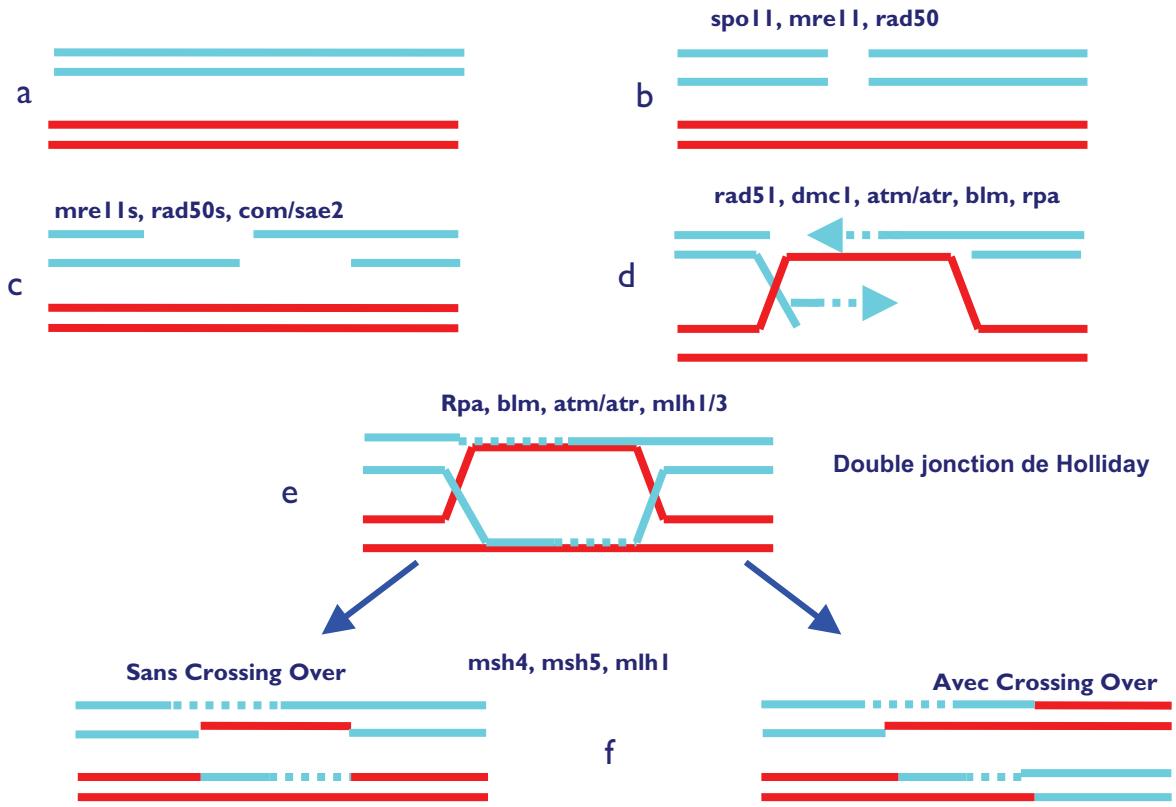


Figure 13: Schéma de la recombinaison réciproque selon le modèle de la double jonction de Holiday. Une seule chromatide sœur de chaque chromosome homologue est ici représenté (un homologue en rouge, l'autre en bleu).

Fig 13a : Les deux molécules d'ADN sont intactes, l'une d'origine paternelle (bleue) l'autre d'origine maternelle (rouge).

Fig 13b: Formation des cassures double-brin sur une des molécules d'ADN

Fig 13c: Dégradation des extrémités 5' et formation d'extrémités 3' saillantes

Fig 13d: Synthèse d'ADN et invasion de la molécule d'ADN homologue

Fig 13e: Formation des doubles jonctions de Holliday

Fig 13f : Résolution des jonctions de Holliday avec ou sans crossing over.

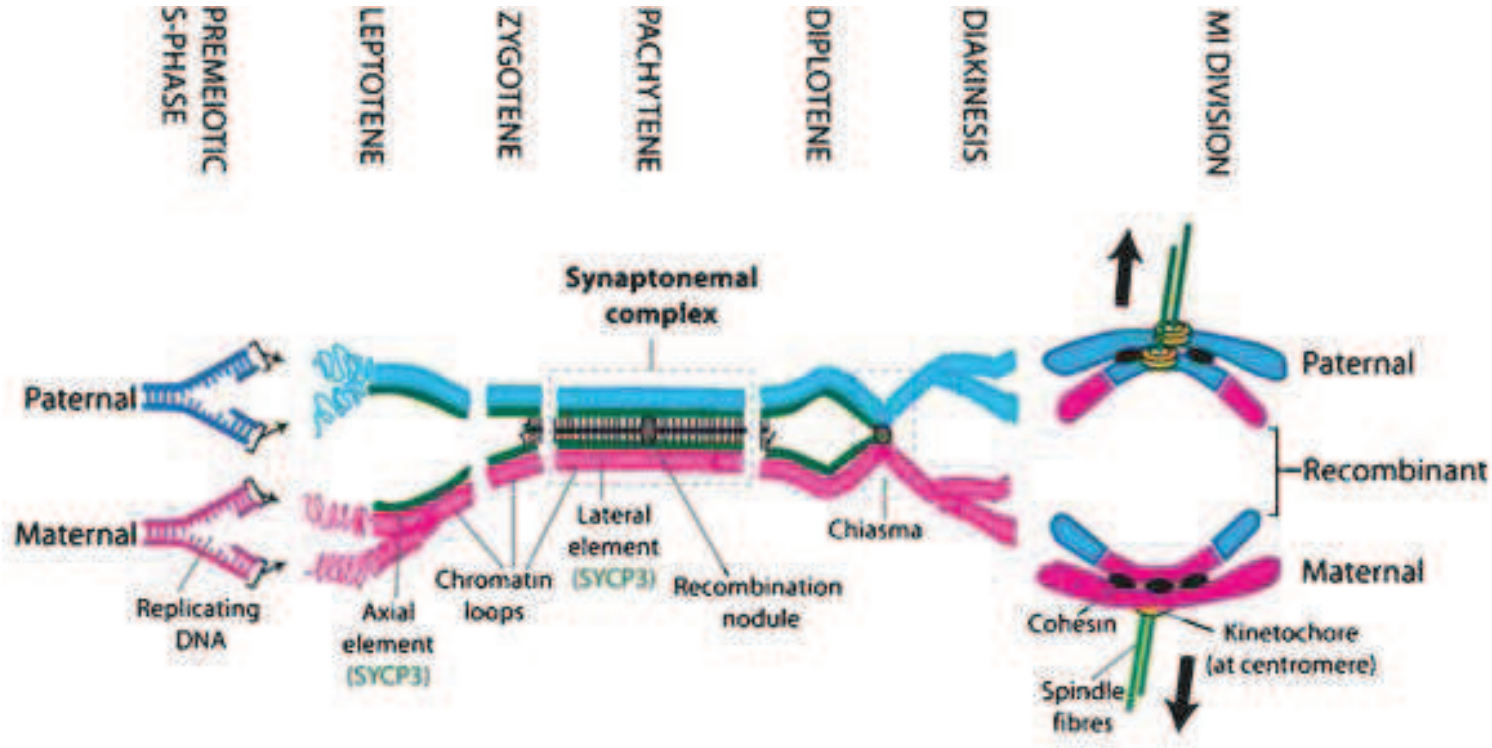


Figure 14

Après la réplication pré-méiotique de l'ADN, la chromatine des chromosomes paternel et maternel est assemblée durant le stade Leptotène sur les éléments axiaux (axial element, SCP3 positif), qui maintiennent les boucles de chromatine (chromatine loops). Durant le stade Zygotène, l'appariement des éléments axiaux du CS est réalisé, ils forment alors les éléments latéraux du CS. L'appariement complet marque le début du stade pachytène, durant lequel certains événements de recombinaison situés dans les nodules de recombinaison (recombination nodule) sont convertis en « crossing over », qui constituent des liens d'ADN entre les homologues paternel et maternel. Ils apparaissent sous la forme de « chiasmas » au stade Diplotène, lorsque les éléments latéraux se séparent (d'après Burgoyne et coll. 2007).

MATERIELS ET METHODES

I- Le modèle ex-vivo : culture de tubes séminifères

1- Présentation

Il s'agit de cultures de tubes séminifères permettant de reproduire ex-vivo le déroulement de la spermatogenèse. Ce modèle, d'ores et déjà publié (Hue et coll. 1998 ; Staub et coll. 2000), a été validé par l'équipe du Dr Durand et collaborateurs sur de nombreux aspects de la physiologie (Perrard et coll. 2003, Vigier et coll. 2004, Godet et coll. 2004, 2008). Les cultures de tubes séminifères représentent un modèle **ex-vivo** d'étude de la spermatogenèse, terme préfére à celui **d'in-vitro**. En effet, en sciences, la définition de « ex-vivo » réfère à *une expérience/mesure réalisée sur ou dans un tissu dans un environnement artificiel, à l'extérieur de l'organisme, avec une altération minimum des conditions naturelles. Ces conditions permettent de recréer un environnement le plus proche possible de l'environnement naturel tout en le contrôlant plus précisement que lors d'expérimentation in vivo.* Les expériences dites « in vitro », ne cherchent pas quant à elles à reproduire forcément l'environnement naturel.

Les rats sont sacrifiés à J20, leurs testicules rapidement dilacérés, l'albuginée retirée et les tissus digérés par la collagénase à 32°C pendant 10 mn sous agitation. Après dilacération des tubes séminifères et nouvelle digestion, la suspension cellulaire contenant l'ensemble des cellules germinales et somatiques obtenues est déposée dans le compartiment apical de la chambre bicamérale à une concentration de 10^6 cellules/cm^2 (fig 15). L'incubation se fait ensuite à 32°C sous une athmosphère contrôlée à 5% de CO2 dans un milieu de culture supplémenté en antibiotiques, serum fœtal, testostérone, vitamines…(pour détails : Hue et coll. 1998). Dans ce modèle, la culture peut être poursuivie jusqu'à 4 semaines permettant de reproduire ex-vivo la spermatogenèse du rat.

Le milieu basal de la chambre bicaméral est renouvellé toutes les 48h tandis que le compartiment apical contenant les cellules, n'est pas renouvelé du début à la fin de la culture afin de respecter au mieux l'organisation architecturale des tubes séminifères et de concentrer le milieu en facteurs nécessaires à la différenciation germinale. Les échanges sont possibles à travers une membrane semi-perméable séparant les 2 compartiments.

Aux jours sélectionnées de culture, les cellules sont détachées des puits par action de la trypsine, lavées et remises en suspension dans un milieu neuf contenant un cryoprotecteur afin de permettre leur conservation.

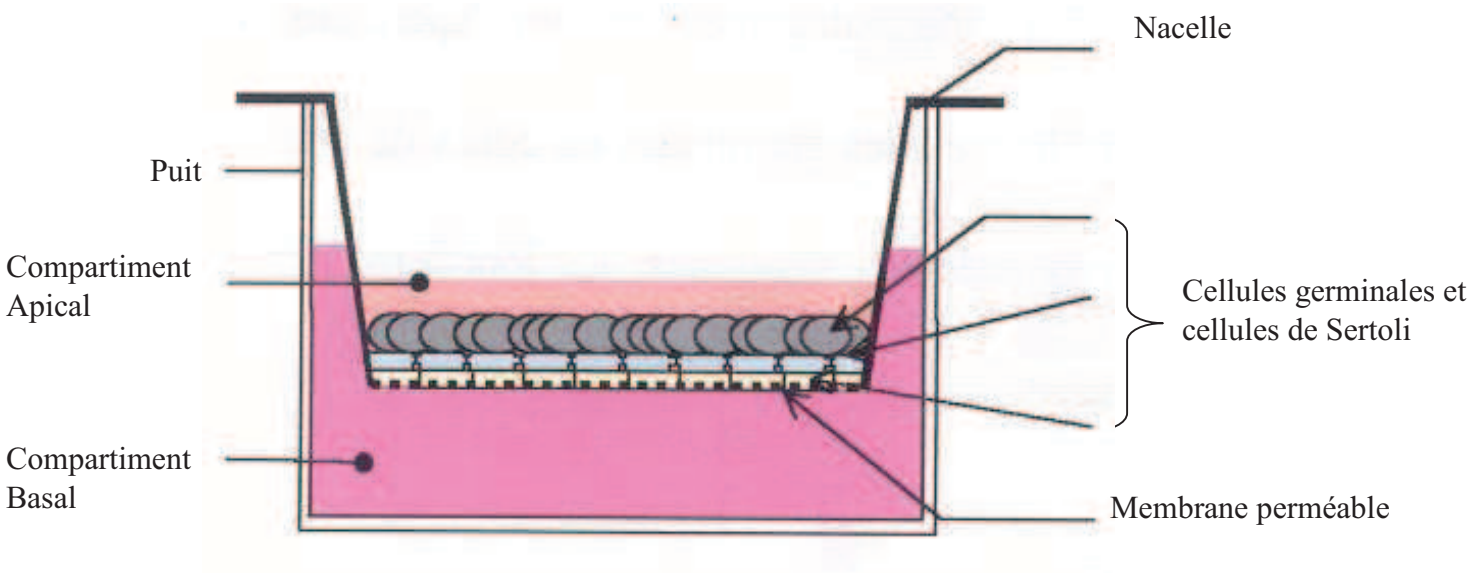


Figure 15: Schéma du système de culture en chambre bicamérale, Perrard et coll. 2009.

2- Intérêts du modèle

Ce système permet d'obtenir des résultats au plus près des processus physiologiques. L'équipe du Dr Durand, de l'Institut de Génomique Fonctionnelle à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon, a ainsi montré que l'ensemble du processus méiotique d'un mammifère peut se dérouler ex-vivo (Staub et coll. 2000) et que les caractéristiques de la méiose qui se déroule ex-vivo sont très proches de ce qui se produit dans les testicules de rat à la puberté (Perrard et coll. 2003). Par ailleurs, nous montrons dans ce travail que les pourcentages de spermatocytes aux différents stades de la prophase I, sont les mêmes chez des rats de 42 jours et dans des tubes séminifères prélevés chez des rats âgés de 23 jours, et maintenus 16 jours en culture, ce qui indique un développement similaire in vivo et ex-vivo (Geoffroy-Siraudin et coll. 2010).

Ce type de modèle ex-vivo a permis d'étudier les mécanismes de régulation de la spermatogenèse en précisant le rôle du MPF (M-phase promoting factor) (Godet et coll. 2004), de la FSH et de la testostérone (Vigier et coll. 2004), des MAP kinases sertoliennes. Les contacts étroits entre cellule de Sertoli et cellules germinales, qui comme nous l'avons vu précédemment sont indispensables à la bonne progression méiotique des spermatocytes, sont totalement préservés dans ce modèle (Godet et coll. 2008). Les médiateurs intercellulaires agissent localement par effet paracrine (testostérone, facteurs de croissance, cytokines,neurotrophines) ou par contact direct entre cellules adjacentes. Grâce à la conservation de l'architecture des tubes séminifères, le micro-environnement testiculaire est préservé, et les communications entre cellules de Sertoli et cellules germinales sont maintenues via les GAP jonctions.

Ce système de culture est aussi pertinent pour évaluer les effets toxiques de substances chimiques sur la spermatogenèse, tout en réduisant (de 10 à 20 fois) le nombre d'animaux utilisés. La substance à tester est ajoutée dans le compartiment basal de la chambre bicamérale

ce qui permet de mimer ce qui pourrait se produire dans le testicule. En effet, les jonctions cellulaires entre les cellules de Sertoli et entre cellules de Sertoli et cellules germinales sont maintenues dans ces cultures et les composés doivent traverser cette barrière avant d'atteindre les cellules germinales. Dans un système classique de culture, un composé peut être toxique pour les cellules germinales différenciées car directement en contact avec celles ci, ce qui ne reflète pas ce qui se passe in vivo où ce même composé n'a peut être pas accès au compartiment des tubes séminifères contenant les cellules germinales. Ce modèle permet d'étudier un grand nombre de paramètres et de déterminer les mécanismes de la toxicité gonadique de faibles concentrations de composés organiques ou minéraux. La connaissance du mode d'action de ces molécules aidera à vérifier si les observations faites chez les animaux sont transposables à l'homme. L'analyse des altérations observées dans une même population cellulaire exposée ou non à la substance à analyser permet de s'affranchir d'une grande partie de la variabilité inter-animaux rencontrée in vivo et d'optimiser ainsi la puissance des tests statistiques.

II- Techniques d'immunocytochimie pour l'étude de la méiose

1- Les anticorps utilisés

L'étude des chromosomes méiotiques a largement bénéficié des progrès techniques: la détection fluorescente de protéines spécifiques de la méiose a remplacé les colorants habituels (giemsa, métaux lourds), et a permis d'obtenir en microscopie optique (MO) des résultats identiques à ceux obtenus dans les techniques plus complexes de microscopie électronique (ME). Nous disposons aujourd'hui d'un arsenal d'anticorps utilisables en immunocytochimie

nous permettant de suivre le déroulement de la méiose en étudiant à la fois l'appariement et la recombinaison génétique.

Les AC les plus fréquemment utilisés pour étudier la cohésion des chromatides sœurs, l'appariement et la recombinaison génétique sont les suivants. Ils peuvent être utilisés seuls ou en association.

- **REC8 :** est une cohésine qui renseigne sur l'état de cohésion des chromatides sœurs (Xu et coll. 2005). Angell et coll. (1994) ont ainsi montré qu'un grand nombre de trisomies 21 proviennent de la séparation précoce des chromatides sœurs (PSSC) au cours de la première division méiotique maternelle. Vialard et coll. (2006) montrent que ce mécanisme de PSSC est impliqué dans 80% des cas d'aneuploïdies dans les ovocytes de la femme de plus de 38 ans. Ce même mécanisme peut être à l'origine d'aneuploidies dans les spermatozoïdes

Pour visualiser l'appariement des chromosomes :

- **SCP1 (Synaptonemal Complex Protein 1):** marque les filaments transverses du complexe synaptonémal (Guichaoua et coll. 2005, Judis et coll. 2004; Sun et coll. 2005).
- **SCP3 (Synaptonemal Complex Protein 3):** marque les éléments axiaux du CS au leptotène qui deviennent éléments latéraux au stade pachytène. Ce marquage persiste jusqu'au stade diplotène uniquement sur les chiasmas.

Pour évaluer la recombinaison génétique :

- **H2AX (Histone2A, sous-famille X):** L'histone H2AX est phosphorylée immédiatement après la formation de la CDB induite par Spo11, elle est alors notée γH2AX. L'enveloppement de larges régions de chromatine par γH2AX pourrait constituer un signal structural pour recruter les protéines de la recombinaison et de la

réparation de l'ADN, ainsi que les protéines de structure impliquées dans l'appariement et la formation du CS au pachytène (Richardson et coll. 2004).

- **RAD51 (RecA Drosophila):** Rad 51 est requis pour charger Dmc1 sur l'ADN et le complexe Rad51/Dmc1 facilite l'appariement précoce en permettant la recherche d'un ADN duplex homologue (Sung et Robberson. 1995). Le marquage est présent du stade zygotène précoce au stade pachytène tardif (Barlow et coll. 1998).
- **MSH4 (MutS Homolog 4):** agit en interaction avec MSH5 sous forme d'hétérodimère. MSH4 recrute MLH1 ; ces gènes de la famille des gènes de réparation des mésappariements sont impliqués dans la recombinaison méiotique et dans la réparation des mésappariements de l'ADN post-réplication (Richardson et coll. 2004). Il interviendrait aussi dans la régulation de la distance entre les évènements de recombinaison génétique (interférence chiasmatique) (Oliver-Bonet et coll. 2005).
- **MLH1 (MutL Homolog 1):** marque la localisation des chiasmas (Oliver-Bonet et coll. 2005).

Ces anticorps permettent en comptant les spots de fixation, d'évaluer la fréquence des événements de recombinaison génétique et d'étudier leur répartition et leur évolution au cours de la prophase méiotique.

2- Description de la technique

La technique initialement mise au point chez l'homme est parfaitement utilisable chez le rat. Afin d'obtenir des étalements de très bonne qualité, nous utilisons une technique d'étalement par cytospin qui limite considérablement la perte cellulaire (Metzler et Guichaoua. 2000). Cette technique nous permet d'adapter la vitesse de centrifugation à la fragilité de la protéine à étudier. Après fixation des lames à la paraformaldéhyde et perméabilisation au triton, le principe général est de déposer un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt et révélé ensuite par un anticorps secondaire anti-espèce couplé à un fluorochrome. Les noyaux sont alors observés grâce à un microscope à fluorescence de type Axioplan 2 (Zeiss, Germany).

3- Les images obtenues

L'AC anti-SCP3 est le mieux adapté à la description des différents sous stades de la prophase I. Il marque les spermatocytes du stade Leptotène au stade Diplotène. Ce marquage nous permet de réaliser une étude quantitative et qualitative des noyaux.

a- Aspect des sous stades de prophase I chez le rat

L'anticorps anti-SCP3 permet d'identifier précisément les différents sous stades de prophase de première division méiotique et d'en évaluer les pourcentages respectifs (Fig. 16)

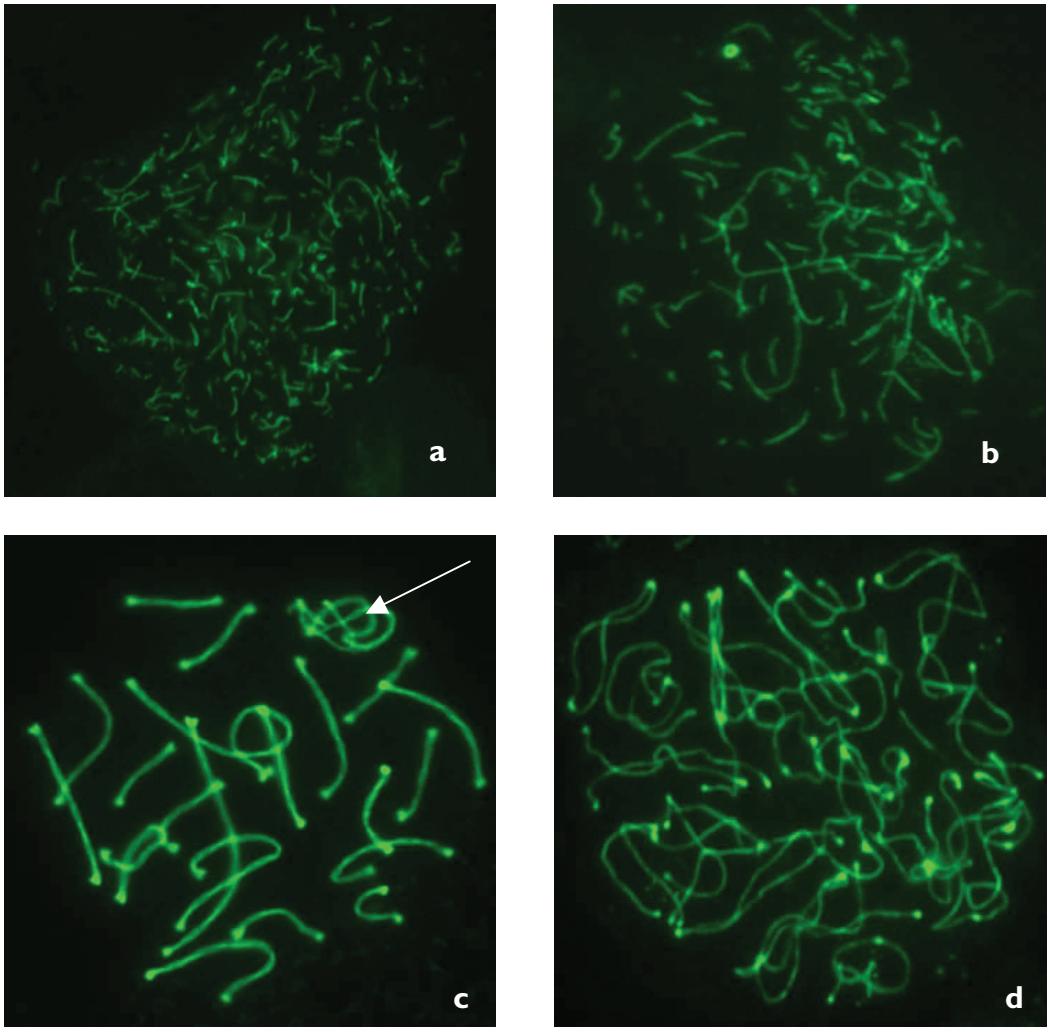


Figure 16: Spermatocytes marqués par l'anticorps anti-SCP3 au stade leptotène (a), zygotène (b), pachytène (c) et diplotène (d). Au stade pachytène la vésicule sexuelle représentée par les chromosomes X et Y est visualisée par la flèche.

b- Analyse qualitative

Il s'agit d'analyser les noyaux visualisés au stade pachytène et de quantifier la présence des anomalies les plus fréquemment retrouvées au cours de la méiose (fig 17) :

- une fragmentation des CS
- des défauts d'appariement notés asynapsis. Ils peuvent toucher un nombre plus ou moins important de bivalents par noyaux et être complets ou partiels le long des bivalents.
- des anomalies de condensation des bivalents et des CS donnant des images dites en pointillés
- des anomalies d'aspect des CS, apparus lors de l'introduction des toxiques comme des images dites « mitées »

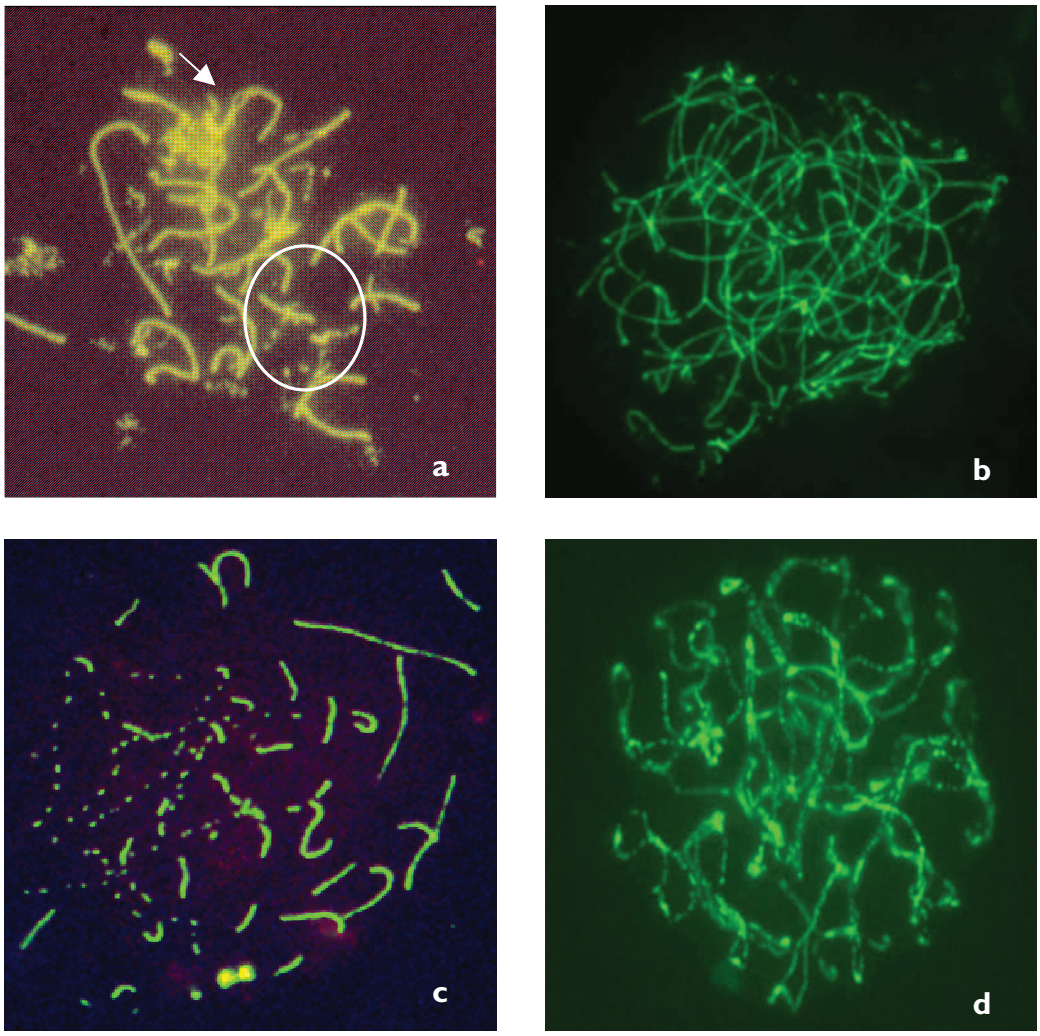


Figure 17: Anomalies qualitatives observés sur les spermatocytes au stade pachytène avec un marquage par l'anticorps anti-SCP3.

Photo a: spermatocyte présentant un asynapsis partiel (flèche courte) et des bivalents fragmentés (entourés).

Photo b : Grands asynapsis étendus touchant l'ensemble des bivalents

Photo c : Images en pointillés

Photo d : Aspect « mité» des CS

OBJECTIFS

Le premier objectif de notre travail est d'évaluer l'évolution des paramètres du sperme sur 20 ans chez les patients ayant réalisé un spermogramme dans le laboratoire de Biologie de la Reproduction de l'Hôpital de la Conception à Marseille. L'établissement de règles très strictes d'analyse, dès l'ouverture du laboratoire, dans le but de pouvoir exploiter les résultats des spermogrammes ainsi que le faible mouvement du personnel médical et technique, ont permis de réaliser ce travail. Nous avons ainsi collecté les données de 17 870 spermogrammes chez 11 330 hommes de 1988 à 2007. Bien que tous les travaux publiés dans diverses régions du monde ne montrent pas de façon homogène une altération globale des paramètres spermatiques, il existe aujourd'hui un consensus sur l'impact de notre environnement sur la fertilité masculine. Une première publication danoise a récemment révélé une diminution de la fécondité clinique des couples en relation avec l'altération des paramètres du sperme dans ce pays. L'impact de l'environnement sur la fertilité masculine est néanmoins variable selon la population et la zone géographique étudiée et il est aujourd'hui nécessaire que chaque région puisse suivre localement l'ampleur du phénomène.

Notre deuxième objectif est de développer un modèle expérimental qui nous permette d'aborder les différents aspects et les mécanismes d'action des toxiques environnementaux sur le testicule. Notre expérience de la méiose humaine nous a permis d'adapter notre méthodologie à l'étude ex-vivo de la méiose du rat. Nous avons appliqué la technique d'immunocytochimie à l'étude de la prophase de la première division, étape clé de la méiose, sur les cellules germinales de rat obtenues grâce au modèle de culture de tubes séminifères développé par l'équipe du Dr Durand et collaborateurs (Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon). Notre choix d'étudier cette étape de la méiose a été justifié par l'importance des évènements qui s'y déroulent et donc par les conséquences, sur la suite de la spermatogenèse, de toute altération de ce processus.

Dans ce but, il est tout d'abord indispensable de décrire de façon parallèle la fréquence de chacun des stades de la prophase de première division méiotique chez le rat in vivo puis dans les cellules germinales obtenues en culture. Nous réaliserons de plus une étude qualitative des spermatocytes au stade pachytène : l'analyse des complexes synaptonémaux nous permettant d'étudier les deux processus fondamentaux de la méiose : appariement et recombinaison génétique. Ce travail préliminaire va nous permettre de valider le modèle de Durand et collaborateurs pour des études toxicologiques. Ce modèle de culture de cellules germinales mâles avec des cellules de Sertoli, en chambre de type « bicaméral », maintient la barrière hémo-testiculaire et permet l'étude du processus spermatogenétique sur une période de 4 semaines chez le rat. Il a été validé du point de vue physiologique sur de nombreux aspects. Nous désirons montrer par ce travail que ce modèle de culture est aussi pertinent pour étudier les effets toxiques des substances chimiques sur le testicule.

L'introduction de substances toxiques dans ces cultures nous permettra d'apprécier les modifications provoquées par ces toxiques dans les cellules germinales et les cellules somatiques. Notre choix de débuter ces travaux de reprotoxicité par l'étude de l'effet des métaux lourds sur le déroulement de la méiose est justifié par leur présence en grande quantité dans notre environnement et en particulier dans les fumées industrielles de la métallurgie. Ils peuvent ainsi contaminer l'homme par inhalation ou par ingestion car ils sont facilement transférés du sol vers les végétaux dont ceux qui font partie de notre alimentation.

Notre premier travail sera d'étudier le comportement des cellules méiotiques au cours de la prophase de la première division après introduction de **Chrome (VI)** dans le milieu de culture à de faibles doses (1, 10 et 100 µg/L), correspondant à des doses que l'on peut retrouver dans le sang d'hommes sains, qui ne sont pas particulièrement exposés professionnellement ou accidentellement à des doses importantes de chrome.

Nous poursuivrons ce travail par l'étude des effets toxiques d'un autre métal lourd, le **Cadmium**, dont la principale source d'exposition est la tabagisme. Là encore, nous utiliserons de faibles doses de Cadmium : 0.1, 1 et 10 µg/L

PREMIERE PARTIE

Etude de l'évolution des paramètres du sperme entre 1988 et 2007 dans la région marseillaise chez 11 330 hommes ayant consulté au centre de Procréation Médicalement Assistée

Depuis environ cinq décennies, de nombreuses études suggèrent un déclin de la qualité spermatique dans différentes régions du monde. En 1992, Carlsen et coll. publient une large méta-analyse regroupant plus de 60 études qui montre une évolution alarmante des paramètres du sperme avec une chute de la concentration en spermatozoïdes d'environ 50% sur les 5 dernières années.

Cette première étude a soulevé beaucoup de controverses mais depuis de nombreux autres auteurs se sont intéressés au sujet et plusieurs d'entre eux montrent une altération des paramètres du sperme dans différents pays que ce soit au sein de populations d'hommes fertiles ou infertiles. Auger et coll. (1995) ont ainsi montré une diminution des trois principaux paramètres du sperme (numération, mobilité, formes typiques) chez 1750 hommes donneurs de sperme, de 1973 à 1992. Dans ce laps de temps, la concentration moyenne des spermatozoïdes a baissé de 2,6% par an, pour tomber de 89 millions/ml en 1973 à 60 millions/ml en 1992 ; les pourcentages de spermatozoïdes mobiles et normaux ont eux-mêmes respectivement diminué respectivement de 0,3% et 0,7% par an. Ces résultats ont été confirmé par d'autres études faites dans les populations générales de différents pays (Swan et coll. 1997, Andersen et coll. 2000) mais aussi chez les hommes consultant pour infertilité clinique (Adamopoulos et coll. 1996, Lackner et coll. 2005, Spirada et coll. 2007, Feki et coll. 2009, Mukhopadhyay et coll. 2010) ou chez des donneurs de sperme considérés comme fertiles (Irvine et coll. 1996, Van Waeleghem et coll. 1996, Shine et coll. 2008). En 2008, pour la première fois, Jensen et coll montrent au Danemark une répercussion possible de cette tendance sur la fécondité clinique des couples : le taux total de grossesse naturelle (taux de grossesse + taux d'interruption volontaire de grossesse – taux de grossesse après assistance médicale à la procréation) calculé et projeté pour 706 270 femmes danoises nées entre 1960 et 1980 semble être inversement lié aux années de naissance : les femmes les plus jeunes montrant un taux de grossesse inférieur à celui de leurs aînées.

Cependant, d'autres études ne retrouvent pas de déclin de la qualité spermatique (Berling et Wölner-Hanssen 1997, Rasmussen et coll. 1997, Emanuel et coll. 1998, Seo et coll. 2000, Itoh et coll. 2001, Costello et coll. 2002, Marimuthu et coll. 2003) ce qui suggère des différences

régionales dans la qualité du sperme. Cependant, la durée d'étude sur 10 ans choisie par certains auteurs est sans doute trop courte pour mettre en évidence le phénomène (Berling et Wölner-Hanssen 1997, Seo et coll. 2000, Marimuthu et coll. 2003). En France, l'étude de Bujan et coll. (1996) réalisée à Toulouse chez des donneurs de sperme ne retrouve aucune diminution de la numération en spermatozoïdes entre 1977 et 1992 ce qui est en contradiction avec le travail d'Auger et coll. (1995) réalisé à Paris. Les auteurs évoquent des différences dans les modes de vie et les expositions aux pollutions industrielles entre les 2 régions pour expliquer cette discordance. Il existe donc de grandes variations selon la zone géographique étudiée (Paulsen et coll. 1996, Lipshultz et coll. 1996, Jorgensen et coll. 2001) et il est important que les laboratoires suivent localement l'évolution des paramètres du sperme au cours du temps (Cooper et coll. 2010). Dans notre étude, nous avons ainsi analysé l'évolution des paramètres du sperme dans la population des hommes ayant consulté pour infertilité conjugale au Laboratoire de Spermiologie de l'hôpital de la Conception à Marseille entre 1988 et 2007. Cela représente 17 870 spermogrammes, réalisés chez 11 330 hommes sur une période de 20 ans. Nous avons dans un deuxième temps réalisé les mêmes analyses statistiques dans un sous-groupe contrôle de 12 064 spermogrammes sélectionnés comme ayant une numération totale normale, supérieure à 40 millions par éjaculât.

Les échantillons de sperme ont été recueillis par masturbation au laboratoire après une période d'abstinence sexuelle de 3 à 6 jours, puis incubés pour liquéfaction 30 minutes à 37°C. Les méthodes d'analyse utilisées sont celles recommandées par l'OMS (WHO 1992, 1999) et n'ont pas changé durant les 20 ans de l'étude. Nous avons tenu compte dans notre analyse des modifications apportées durant cette période dans l'interprétation et la façon de présenter les résultats. Les paramètres suivants ont été analysés : volume, pH, concentration des spermatozoïdes en million/ml , numération totale des spermatozoïde en million par éjaculât, mobilité, vitalité et morphologie.

Pour la mobilité nous présentons l'évolution de 2 paramètres : la mobilité totale et la mobilité progressive rapide. Les types de mobilité identifiés ont en effet été modifiés entre 1995 et

1996 pour passer de 3 classes : mobilité normale, diminuée, immobile ; à 4 classes :progressifs rapides (anciennement mobilité normale), progressifs lents, non progressifs et immobiles.

Pour l'analyse morphologique, nous utilisons la classification décrite par David et coll. en 1975 puis modifiée par Auger et Eustache en 2000. Ces modifications concernent :

- la tête des spermatozoïdes : l'intitulé « tête irrégulière » a été scindé en 2 items : « anomalies de l'acrosome » (absent ou malformé) et « anomalies de la région post acrosomique ». Dans notre étude, nous présentons pour les 20 ans l'évolution du paramètre « tête irrégulière » en additionnant les 2 anomalies à partir de 2003, moment où la distinction faite par Auger et Eustache a été mise en pratique au laboratoire.

- le cou et le flagelle : 3 nouvelles anomalies ont été ajoutées à la classification: les insertions asymétriques du flagelle, devant être dorénavant considérées comme des angulations, les pièces intermédiaires grêles et les flagelles de calibre irrégulier. C'est pourquoi pour le pourcentage de spermatozoïdes présentant une angulation et pour le pourcentage global de formes typiques nous avons choisi d'arrêter notre analyse statistique fin 2002, juste avant ces changements.

L'analyse statistique des données a été faite à l'aide du logiciel SPSS version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Les variables continues sont exprimées sous forme de moyenne +/- écart-type ou médiane avec leur intervalle inter-quartile (IQR 25%-75%) selon leurs distributions. La régression linéaire a été utilisée pour évaluer la tendance à long terme des paramètres du sperme. Afin de tenir compte de l'augmentation de l'âge moyen des hommes ayant consulté au laboratoire pendant la durée de l'étude (34.2 $\pm$ 5.8 ans en 1988 à 36.5 $\pm$ 5.3 ans en 2007 (R^2=0.837, $p<0.001$), nous avons utilisé un modèle d'analyse multivariée. Tous les tests statistiques sont considérés en bilatéral et considérés comme significatifs si $p<0.05$.

Les résultats de notre étude montrent que la population consultant dans notre centre d'infertilité à Marseille n'échappe pas au phénomène décrit dans de nombreuses autres régions du monde. Nous retrouvons une altération significative des principaux paramètres du sperme (numération, mobilité, morphologie), y compris dans le sous-groupe sélectionné de spermogrammes présentant pourtant une numération totale normale.

Entre 1988 et 2007, nous observons une décroissance significative de 1,4% par an de la concentration en spermatozoïdes (R^2=0.681, p=0.001) dont la médiane passe de 42.9 Millions/ml en 1988 à 31.7 Millions/ml en 2007. De même, la numération totale en spermatozoïde chute de 1,5% par an (R^2=0.681, p=0.005) avec une médiane qui passe de 113.1 Millions en 1988 à 94.7 Millions en 2007. Les moyennes par an pour ces 2 paramètres restent toujours supérieures aux valeurs dites « normales ». Cependant la même décroissance est observée à moindre échelle dans le sous-groupe contrôle (R^2=0.617, p=0.005, 0.9% par an pour la concentration en spermatozoïdes ; et R^2=0.628, p=0.05, 1.2% par an pour la numération totale). Nous avons isolé pour chaque année le pourcentage de spermogrammes présentant une azoospermie. Celui-ci augmente significativement au cours de l'étude pour passer de 3.4% en 1988 à 4.5% en 2007 (R^2=0.291, p=0.014).

La mobilité totale ne montre pas de déclin significatif durant la période de l'étude. Cependant, la mobilité progressive rapide (anciennement mobilité normale avant 1996) montre une diminution très importante de 5.6% par an entre le début et la fin de l'étude (R^2=0.861, p<0.001). Cette tendance, confirmée dans la population contrôle, peut avoir des répercussions importantes sur la fertilité de ces hommes. Comhaire et coll. (1987) ont ainsi montré que le pourcentage de spermatozoïdes progressifs rapides est le meilleur indicateur de la capacité fécondante d'un sperme.

Le pourcentage de formes typiques montre lui-aussi une décroissance significative avec le temps dans les 2 populations (R^2= 0.640, p<0.001, 1.9% par an et R^2=0.560, p=0.001, 1.5% par an respectivement). Notre travail est le premier à étudier le détail des anomalies

cytologiques observées en prenant en compte les modifications intervenues dans la classification. Nous montrons une augmentation polymorphe des anomalies du spermatozoïde touchant à la fois la tête, le cou et le flagelle.

Les différents biais pouvant interagir avec nos résultats ont été écartés. Les techniques d'analyse n'ont pas changé et il y a eu une parfaite continuité dans le personnel impliqué: le médecin responsable du service et une partie des techniciennes étant les mêmes depuis l'ouverture du laboratoire. Les modifications dans les recommandations de l'OMS ont été intégrées puisque nous avons tenu compte dans notre analyse des évolutions pour la lecture de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes. Enfin, l'avènement de l'ICSI en 1995 dans notre service ne peut pas non plus expliquer le déclin observé. La proportion d'ICSI dans notre centre (45%) n'a pas significativement varié depuis 1998 et la pente de la courbe de la concentration en spermatozoïde ne s'infléchit pas brutalement depuis l'avènement de l'ICSI. Le nombre de spermogramme par patient n'a pas augmenté au cours des 20 ans de l'étude, le laboratoire de spermiologie reçoit les patients en première intention, sans aucune sélection, indépendamment de leur future prise en charge en AMP. Le laps de temps moyen s'écoulant entre le premier et le dernier spermogramme réalisé pour un patient est de 20.9 $\pm$ 10.5 mois, soit des temps de prises en charge de 2 à 3 ans en moyenne ne pouvant pas expliquer une décroissance sur une période de 20 ans. Enfin, avant 1995, les patients atteints d'une oligo-asthéno-tératospermie sévère étaient malgré tout régulièrement contrôlés et proposés pour une prise en charge au CECOS avec donneur de sperme.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer tout ou partie de ce déclin des paramètres spermatiques. Il faut prendre en compte le rôle des infections génitales (Feki et coll. 2009), l'origine multi-ethnique de la population étudiée et la variabilité des modes de vie. Néanmoins, l'hypothèse environnementale développée par Sharpe et Skakkebaek (1993)

semble primordiale. Les facteurs environnementaux agissant dès la vie fœtale, puis pendant l'enfance, la puberté et jusqu'à l'âge adulte, peuvent avoir un effet délétère sur les paramètres du sperme. Il est essentiel de poursuivre cette surveillance car si ce déclin se poursuit, il retentira inévitablement sur la fertilité clinique des hommes. Dans une société où le coût de la santé représente une part non négligeable des dépenses publiques, le recours de plus en plus fréquent aux techniques d'assistance médicale à la procréation pour palier aux altérations de la reproduction humaine devient un véritable enjeu de santé publique.

Parallèlement, nous devons clairement identifier les substances repro-toxiques nous entourant et découvrir leurs modes d'action. C'est pourquoi la deuxième partie de notre travail a consisté à mettre un point un nouvel outil de repro-toxicologie, applicable à de nombreux toxiques et à de nombreux tests toxicologiques tout en répondant aux exigence de l'union européenne en terme d'économies d'animaux sacrifiés (Perrard et coll. 2009).

Decline in semen quality among 11 330 men visiting an infertility centre over a 20-year period in Marseilles

Geoffroy-Siraudin C, Loundou AD, Courbière B, Achard V, Grillo JM, Perrard MH, Durand Ph, Guichaoua MR

Soumis à Journal of Andrology

DECLINE IN SEMEN QUALITY AMONG 11 330 MEN VISITING AN INFERTILITY CENTRE OVER A 20-YEAR PERIOD IN MARSEILLES

Cendrine Geoffroy-Siraudin,M.D.,[1,2], Anderson Dieudonné Loundou,Ph.D.,[3], Blandine Courbière,M.D,Ph.D.,[24], Vincent Achard,M.D,Ph.D.,[1], Jean-Marie Grillo,M.D,Ph.D.,[1,2], Marie-Hélène Perrard,Ph.D.,[5], Philippe Durand,Ph.D.,[5], Marie-Roberte Guichaoua,M.D,Ph.D.,[12]

[1] Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Hôpital de la Conception, Marseille, France.

[2] EA 1784, Laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale, Université d'Aix-Marseille II, ECCOREV, Europôle de l'Arbois.

[3] Unité d'Aide Méthodologique à la Recherche clinique DRRC/AP-HM, Laboratoire de Santé Publique Faculté de Médecine, Marseille, France.

[4] Centre de Procréation Médicalement Assistée, Hôpital de la Conception, Marseille, France.

[5] Institut de Génomique fonctionnelle de Lyon, Université de Lyon, CNRS, INRA, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France.

Running title : Decline in semen quality

Corresponding author : Pr. Marie-Roberte Guichaoua, mguichaoua@ap-hm.fr

Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Hôpital de la Conception, 147 Bd baille, 13385 Marseille cedex 5, France. Tel : +33.4.91.38.37.10 Fax : +33.4.91.38.38.97

This work was supported by grants from Assistance Public of Marseille.

ABSTRACT

Objective: To determine if semen quality has declined in those men consulting for couple infertility in the Reproduction Biology Laboratory of the University Hospital of Marseilles, France, over a period of 20 years, from 1988 to 2007. **Design:** Retrospective cohort study. **Patients:** 11 330 men consulting for infertility of their couple. The statistical analyses were performed on the whole number of semen samples (17 870) and among them, on the selected samples with a normal sperm count (12 064). As age influences the characteristics of semen, multiple linear regression models were used to assess the effect of age on semen characteristics. **Intervention:** Semen samples collected after 3-6 days of abstinence. **Main outcome measures:** Volume of seminal fluid, pH, sperm concentration, total sperm count, motility, morphology, presence of immature germ cells, number of neutrophil leucocytes. **Results:** The same trends of deterioration were observed in the whole population studied and in the selected samples with a normal sperm count: significant decreases in sperm concentration (1.4% and 0.9% per year respectively), in total sperm count (1.5% and 1.2% per year, respectively), in rapid motility (5.6% and 5.3% per year respectively) and in typical morphology (1.9% and 1.5% per year respectively). Possible bias of selection are discussed. **Conclusion**: Our results clearly indicate that the quality of semen decreased in the patients consulting in our centre over the 20 year study period.

KEY WORDS

Semen analysis, sperm concentration, sperm motility, sperm morphology, male infertility.

INTRODUCTION

Numerous studies have suggested a global decline in semen quality in some parts of the world (Carlsen et al. 1992, Auger et al. 1995, Adamopoulos et al. 1996, Van Waeleghem et al. 1996, Lackner et al. 2005, Spirada et al. 2007, Shine et al. 2008, Mukhopadhyay et al. 2010). All these studies established a relationship between sperm quality and environmental and/or occupational exposure. By contrast, other studies have shown no evidence of deteriorating semen quality (Berling and Wölner-Hanssen 1997, Rasmussen et al. 1997, Emanuel et al. 1998, Seo et al. 2000, Itoh et al. 2001, Costello et al. 2002, Marimuthu et al. 2003) suggesting regional differences in semen quality (Paulsen et al. 1996, Lipshultz 1996, Jorgensen et al. 2001). It is important to emphasize that some of these above studies concerned infertile couple (Adamopoulos et al. 1996, Berling and Wölner-Hanssen 1997, Seo et al. 2000, Marimuthu et al. 2003, Lackner et al. 2005, Spirada et al. 2007, Mukhopadhyay et al. 2010) whereas in other studies, analyses were performed in men with "normal" sperm parameters (Auger et al. 1995, Van Waeleghem et al. 1996, Bujan et al. 1996, Costello et al. 2002, Shine et al. 2008). In France, the study of Auger et al. (1995) in Paris and that of Bujan et al. (1996) in Toulouse focused on semen donor candidates in two different regions, gave conflicting results. The first study found that the characteristics of semen from a fertile man of a given age in 1992 were significantly poorer than those of a fertile man of the same age in 1973. In the second study, the authors did not observe any decrease in the sperm count between 1977 and 1992 and suggested that this discrepancy could result from differences in industrial pollution and/or in lifestyle between the two regions. It has never been reported that fecundity is affected by this decrease in sperm parameters until Jensen et al. (2008) who found declining trends in conception rates in cohorts of native Danish women suggested a possible role of deteriorating male reproductive health.

Actually, a worldwide declining trend in semen parameter values can be neither confirmed or rejected (te Velde et al. 2010). Moreover large regional differences appeared to be present and laboratories have to conduct their own local studies for sperm parameter evolution over time (Cooper et al. 2010). The present study had the objective of analysing the evolution of sperm parameters in the "infertile couple population" of Marseilles and its region which is one of the most heavily industrialized region in France. As we have performed a very precise analysis of the sperm morphology from the opening of the laboratory in 1988, we can present the evolution of the normal morphology and of each abnormality taking into account the changes in guidelines introduced during the study period. A total of 17 870 semen analyses in 11 330 men were performed over a 20-year period.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

The present analysis was performed from patients visiting the Reproduction Biology Laboratory of a University Hospital in Marseilles. This laboratory receives patients from Marseilles and its region. A total of 11 330 men, consulting for infertility of the couple, or of the man, between January 1988 and December 2007, were included in this study. The main ethnic groups present in the population were Caucasian, North African and natives of the Comoro islands. All subjects had their semen evaluated in the course of the couple's work-up for subfertility and not because of previous knowledge of sperm abnormality. Approval for this study was obtained from the French institutional review board, the CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés, n° 909493).

A structured medical consultation was conducted during the first visit to obtain informations on medical, surgical reproductive history, illness and treatment, familial history

of infertility and sexuality. Men were also asked about their birthplace, and the detailed history of past and present lifestyle habits and jobs.

First, the statistical analyses were performed on the whole number of semen samples (17 870 semen samples). Then, according to the sperm concentration, we defined 4 groups: normal sperm concentration (>20 Millions/ml) (group 1), oligozoospermia from 5 to 20 Millions/ml (group 2), severe oligozoospermia (<5 Millions/ml) (group 3), and azoospermia (group 4).

Second, we performed statistical analyses solely on the selected samples with a normal sperm count (≥ 40Millions/ ejaculate) corresponding to 12 064 semen samples, according to the results obtained by Mukhopdayay et al. (2010) and Spirada et al (2007).

Semen collection and analyses

Semen samples were collected by masturbation at the laboratory, into a sterile plastic cup. The semen specimen was incubated for 30 min at 37°C for liquefaction. From the first sperm analyses, we fixed the sexual abstinence period in our laboratory at 3-6 days. This is in accordance with the WHO guidelines 1992 and 1999 which recommend a minimum of 48 hours and a maximum of seven days of sexual abstinence.

The following parameters were analysed: volume, pH, sperm concentration, total sperm count, percentages of motility, viability and morphologically normal spermatozoa. The volume of the ejaculate was measured with graduated pipettes. The pH was measured within one hour of ejaculation with a pH paper. Sperm concentration was assessed in a Malassez counting chamber. The motility of spermatozoa was investigated with a Leica phase-contrast microscope fitted with a 40 X objective, and was differently graded from 1988 to 1995 and from 1996 to 2007. During the first period, the motility of each spermatozoon was graded as follow: normal motility, decreased motility or immobility. From 1996 to 2007 the motility was graded as follow: rapid progressive motility, slow progressive motility, non-progressive

motility, and immobility (WHO 1992 a,b,c,d). Spermatozoa graded “normal motility” until 1995 were those graded “rapid progressive motility” in the new classification, whereas spermatozoa with decreased motility correspond to the groups “slow progressive motility” and “non-progressive motility” of the new classification. For this reason, we have only considered in this study the “total motility” and the “rapid progressive motility” groups. Viability was evaluated using the eosin-nigrosin staining method.

The sperm morphology was evaluated at a final magnification of 1000 after Haematoxylin/Shorr staining, according to the method described by David *et al.* (1975) modified by Auger and Eustache (2000). In our laboratory, we applied the Auger’s classification since 2003: for the spermatozoon head, irregular shape in David’s classification was splited into irregular acrosome and irregular post-acrosomal region. We pooled for each sample the frequencies of the two abnormalities (irregular acrosome and irregular post-acrosomal region) and we showed the evolution of “irregular heads” over the study period. For the neck, midpiece and tail, the three abnormalities described by Auger and Eustache (asymetrical insertion, thin midpiece and irregular tail) didn’t appeared in David classification. Asymetrical insertion of the tail had to be classified as bent tail. Since these modifications were introduced in our laboratory in 2003, the evolution of total normal morphology and of bent tail were considered only until the end of 2002. Moreover, in our laboratory, “bent tail” and “bent neck” were always classified together as “bent tail”.

During the 20 years of the study, 4 technicians worked in the laboratory: one during 20 years, one during 10 years and two during 2 years each. The medical director of the laboratory was the same during the 20 years of the study. Technician and medical doctors adhered to strict quality control (Biologie Prospective, Formation Continue Professionnelle, n° 41 54 00025 54). The methods of analysis did not change widely during the 20 years of this study.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using PASW Statistics version 17.0.2 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Continuous variables are expressed as means ± standard deviation (SD) or as median with InterQuartile Range (IQR) (according to their distribution), and categorical variables are reported as count and percentages. Linear regression was used to examine trends over time in the semen characteristics. As age influences the characteristics of semen, multiple linear regression models were used to assess the effect of age and calendar year on semen characteristics. The residuals of the fitted linear models were then utilized as the age-adjusted data (data after adjusting for age). Multiple coefficient of determination (R^2) is presented for each model along with P value .

All the tests were two-sided. The statistical significance was defined as $p<0.05$.

RESULTS

The mean age of the studied population was 35.1 $\pm$ 6.8 years; it increased significantly with time, from 34.2 $\pm$ 5.8 years in 1988 to 36.5 $\pm$ 5.3 years in 2007 ($R=0.837$, $p<0.001$). The mean number of semen samples per patient was 1.6; it did not significantly vary either according to the year of the study, or according to the sperm count. The mean interval between the first and the last semen sample per patient was 20.9 $\pm$ 10.5 months. Neither the seminal fluid volume (3.5 ml $\pm$ 1.8) nor its pH (8.2 $\pm$ 0.3) varied over the study period. Similarly, the sperm viability remained constant (67.5% $\pm$ 23.2). All these parameters were in the range of the normal values of the WHO guidelines 1992 and 1999.

Significant decreases in the mean sperm concentration and the mean total sperm count were observed over the study period ($R^2=0.681$, $p=0.001$ and $R^2=0.681$, $p=0.005$ respectively). The medians varied from 42.9 Millions/ml in 1988 to 31.7 Millions/ml in 2007 for sperm concentration, and from 113.1 Millions in 1988 to 94.7 Millions in 2007 for total

sperm count (table 1). Hence, these two parameters decreased by 1.4 % and 1.5 % per year, respectively. Nevertheless, the mean values of these 2 parameters were always above the normal ranges: mean sperm concentration from 68.9 Millions/ml to 51.9 Millions/ml, and total sperm count from 214.4 Millions to 157.5 Millions. According to the year of the study, there was a significant increase of the proportion of samples allotted in the groups 2 (from 17.2% to 18.2%, R^2=0.266, p=0.002), 3 (from 9.5% to 16.7%, R^2=0.702, p<0.001) and 4 (3.4% to 4.5%, R^2=0.291, p=0.014). By contrast the proportion of samples with a normal sperm count (group1) significantly decreased (from 69.90% to 60.60%, R^2= 0.675, p<0.001). There was no significant decline of the mean percentage of total motile spermatozoa (a+b+c) between 1988 and 2007. However, the rapid motility (group a) significantly decreased over the study period from 25.7% to 8.1%, with a decrease rate of 5.6% per year (R^2=0.861, p<0.001). As expected, the median values (table 1) showed the same trends. Linear regression lines for these parameters are presented in figure 1.

The percentage of spermatozoa with a normal morphology declined between 1988 and 2002 from 43.4% to 32.5%; it exhibited a significant negative correlation with time (R^2=0.640, p<0.001) with a rate of decrease of 1.9% per year (table1). Detailed analyses of the morphological characteristics of spermatozoa showed significant increases of abnormalities of the three regions of the spermatozoa: head, neck and tail (for details see figure 2). The linear regression lines for these parameters are presented in figure 1 and 2. The mean numbers of immature germ cells (spermatocytes I and II, and spermatids) and of neutrophil leucocytes significantly increased of 6.4% per year (R^2=0.206, p=0.039) and 14.6% by year (R^2=0.717, p<0.01), respectively, over the 20-year period of this study.

In the group of selected samples with a normal sperm count, the same trend to deterioration of sperm quality with time was observed. Significant decreases in the mean sperm concentrations from 90.1 Millions/ml to 74.8 Millions/ml, and in the mean total sperm count from 290.6 Millions to 230.6 Millions were observed over the study period (R^2=0.617,

p=0.005 and R^2=0.628, p=0.05 respectively). These two parameters decreased by 0.9 % and 1.2 % per year, respectively. There was no significant decline of the mean percentage of total motile spermatozoa. However the rapid motility significantly decreased over the study period from 30.7% to 10.4% (R^2=0.860, p<0.001, 5.3% per year) as in the whole population (see above). The mean percentage of typical forms presented a significant negative correlation with time between 1988 and 2002 from 46.5% to 37.2% (R^2=0.560, p= 0.001, 1.5% per year).

DISCUSSION

A decrease of semen parameters with time has been shown in many countries over the world (Carlsen et al. 1992, Auger et al. 1995, Adamopoulos et al. 1996, Van Waeleghem et al. 1996, Lackner et al. 2005, Spirada et al. 2007, Shine et al. 2008, Mukhopadhyay et al. 2010). Our results emphasize that the south-east of France does not escape this phenomenon. In this study, we analysed the semen parameter evolution adjusted for age of a large group of patients consulting in our centre (17 870 semen analyses/11 330 men). In this population, we also separately analysed these semen samples with a total sperm count above 40 Millions. During the 20 years of the study, there were few changes in the staff of the centre. All the technicians had the same training and the techniques of study did not change. Few new equipments were introduced which cannot explain the decline of sperm parameters which are reported here.

Between the years 1988 and 2007, we observed significant decreases in both sperm concentration and total sperm count in the whole population (table 1). A less important but still significant decline was observed for the population exhibiting a normal total sperm count. This latter result was confirmed by the significant decrease of the number of samples from the whole population allotted in the group 1. In the azoospermic patients from group 4 undergoing testicular biopsy for Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI), the histopathological study showed that the proportion of non-obstructive azoospermia increased

from 59% to 68% from 2001 to 2007. Although this increase was not significant over this period, it suggests that the increase of azoospermia frequency observed in the present study could result from an increase in spermatogenic failures.

In the present study, although the overall progressive motility did not decrease, we observed a severe decline of rapid progressive motility (grade a) (5.6% per year, table 1) even in the population exhibiting a normal sperm count (5.3%). In the literature, among the eleven studies which were devoted to the trend for motility over time, six found deteriorated motility (Auger et al. 1995, Irvine et al. 1996, Van Waeleghem et al. 1996, Comhaire et al. 2006, Adiga et al. 2008, Mukhopadhyay et al. 2010). Comhaire et al. (1987) have shown that the percentage of spermatozoa with grade "a" motility is the strongest indicator of the potential for in vivo fertilizing capacity of semen. Thus, our results suggest that an increasing proportion of men in our region could be candidates for assisted medical procreation techniques with time.

In the present study, the mean percentage of spermatozoa with a normal morphology has significantly fallen of 1.9% per year (table 1). These results fit with previous data (Auger et al. 1995, Van Waeleghem et al. 1996, Benshushan et al. 1997, Andolz et al. 1999, Bilotta et al. 1999, Comhaire et al. 2006, Adiga et al. 2008, Feki et al. 2009). Detailed analyses showed that several abnormalities in the three regions of spermatozoa increased with time (fig. 2). Further studies will be necessary to identify if the impairment of spermatogenesis results from a failure of Sertoli cell and /or germ cell functions.

Two selection bias could be considered in this study: the advent of ICSI during the study period and the number of semen samples per patient. The advent of ICSI, in 1995 in our centre, cannot explain our results: - the proportion of ICSI (45%) in our centre has not varied since 1998; - the semen analysis laboratory works independently from those of FIV/ICSI and receive all men without any selection; - most of patients visiting our centre for infertility of their couple had no knowledge of their sperm status; - patients with severe male factors who

actually benefit of ICSI were in the past proposed for ART with donor sperm; - finally, the slopes of the curves of mean sperm concentration and total sperm count (Fig 1A et 1B) are not modified by the advent of ICSI from 1995. Similarly, the fact that some men delivered more than one semen sample cannot influence the slope of the curve over a 20 year period. Indeed, the mean interval between the first and the last semen sample per patient was 20.9 $\pm$ 10.5 months.

Several possible causes for this decline of the semen parameters in the Marseilles region may be suspected: among them, infection may be a contributing factor (Feki et al. 2009). Nevertheless, our results may be more likely consistent with the hypothesis advanced by Sharpe and Skakkebaek (1993) that environmental factors acting during either foetal, childhood/pubertal period or adult life, can have detrimental effects on human semen.

Although Marseilles and its region are heavily industrialized, we must also take into account the multiethnic origin of our patients, some of them were not born in the Marseilles region and could have been exposed to environmental factors during foetal life or childhood/pubertal period in other countries.

Thus, it is important to carry on the survey of the semen parameters with time. Presently the decline is linear, but a break in the straight line, if occurring, could predict a severe defect of the reproductive function. Therefore, it is also now essential to identify the etiological factors responsible for the changes over time of the semen quality. Careful exposure assessment to environmental pollutants will be required. In this aim, we have settled a questionnaire to examine the association between self-reported physical or chemical occupational exposures and semen quality (de Fleurian et al. 2009). Moreover, the mechanisms of the deleterious effects of environmental or professional toxicants on spermatogenesis, have to be explored. In this aim, we have recently developed a new approach which uses a validated model of germ cell culture (Perrard et al. 2009). Using this culture model, we have observed that chromium, even at low concentrations, severely alters the course of spermatogenesis by acting on germ

cells from middle spermatocytes to round spermatids; we have also shown that synaptonemal complex abnormalities during the first meiotic prophase significantly increase with the concentration of chromium (Geoffroy-Siraudin et al. 2010).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Professor J.M. Luciani, director of the laboratory of Reproduction at the Conception Hospital of Marseille until 2000, who initiated the computarization of the data, Professors R. Erny and M. Gamerre who successively directed the “Centre de Procréation Médicalement Assistée de Marseille” (CPMA) . We also thank all the physicians of the CPMA and of the department of Urology, the physicians of Marseilles and its region which send us their patients for sperm analysis, and the physicians, the interns and the technicians who have temporarily worked in the laboratory of sperm analysis. We are grateful to Dr JC. Reynier for its legal assistance and to C. Metton, M.J. Fays-Bernardin and D.Daïoglou, for their technical assistance.

REFERENCES

Adamopoulos DA, Pappa A, Nicopoulou S, Andreou E, Karamertzansi M, Michopoulos J, Deligianni V, Simou M. Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the Greater Athens area during the period 1977-1993. Hum Reprod. 1996;11:1936-1941.

Adiga SK, Jayaraman V, Kalthur G, Upadhya D, Kumar P. Declining semen quality among south Indian infertile men: a retrospective study. J Hum Reprod Sci. 2008;1:15-18.

Andolz P, Bielsa MA, Vila J. Evolution of semen quality in North-eastern Spain : a study in 22759 infertile men over a 36 year period. Hum Reprod. 1999;14:731-735.

Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. N Engl J Med. 1995 ;332 :281-285.

Auger J, Eustache F. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. Andrologie. 2000;120:358-373.

Benshushan A, Shoshani O, Paltiel O, Schenker JG, Lewin A. Is there a really decrease in sperm parameters among healthy young men? A survey of sperm donations during 15 years. J Assist Reprod Genet. 1997;14:347-353.

Berling S and Wölner-Hanssen P. No evidence of deteriorating semen quality among men in infertile relationships during the last decade: a study of males from Southern Sweden. Hum reprod. 1997;12:1002-1005.

Bilotta P, Guglielmo R, Steffe M. Analysis of decline in seminal fluid in the Italian population during the past 15 years. Minerva Ginecol. 1999;51:223-231.

Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Mieusset R. Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse between 1977 and 1992. BMJ.1996; 312:471-472.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N and Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. Brit Med J. 1992;305:609-613.

Comhaire FH, Vermeulen L,Schoonjans F. Reassessment of the accuracy of traditional sperm characteristics and adenosine triphosphate (ATP) in estimating the fertilizing potential of human semen in vivo. Int J Androl. 1987;10:653-662.

Comhaire F, Mahmoud A, Schoonjans F. Sperm quality, birth rates and the environment in Flanders (Belgium). Reproductive Toxicology. 2006;23:133-137.

Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre H, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update. 2010;16:231-245.

Costello MF, Sjoblom P, Haddad Y, Steigrad SJ, Bosch EG. No decline in semen quality among potential sperm donors in Sydney, Australia, between 1983 and 2001. J Assist Reprod Genet. 2002 ;19 :284-290.

David G, Bisson JP, Czyglik F, Jouannet P, Gernigon C. Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. Propositions pour un système de classification. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 1975;4:17-36.

Emanuel E, Gobuloff E, Fisch H. MacLeod revisited: sperm counts distributions in 374 fertile men from 1971 to 1994. Urology. 1998;51:86-88.

Feki NC, Abid N, Rebai A, Sellami A, Ayed BB, Guermazi M, Bahloul A, Rebai T, Ammar LK. Semen quality decline among men in infertile relationships: experience over 12 years in the south of Tunisia. J Androl. 2009;30:541-547.

de Fleurian G, Perrin J, Ecochard R, Dantony E, Lanteaume A, Achard V, Grillo JM, Guichaoua MR, Botta A, Sari-Minodier I. Occupational exposures obtained by questionnaire in clinical practice and their association with semen quality. J Androl. 2009;30:566-579.

Geoffoy-Siraudin C, Perrard MH, Chaspoul F, Lanteaume A, Gallice P, Durand P, Guichaoua MR. Validation of a rat seminiferous tubule culture model as a suitable system for studying toxicant impact on meiosis effect of hexavalent chromium. Tox Sci. 2010;116:286-296.

Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E, Aitken J. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. BMJ. 1996;24:467-471.

Itoh N, Kayama F, Tatsuki J, Tsukamoto T. Have sperm counts deteriorated over the past 20 years in healthy young Japanese men? Results from the Sapporo Area. J of Androl. 2001;22:40-44.

Jensen TK, Sobotka T, Hansen MA, Pedersen AT, Lutz W, Skakkebaek N. Declining trends in conception rates in recent birth cohorts of native Danish women: a possible role of deteriorating male reproductive health. Int J Androl. 2008;31:81-92.

Jorgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine S, Suominen J, Petersen J, Andersen AN, Auger J, Cawood EH, Horte A, et al. Regional differences in semen quality in Europe. Hum Reprod. 2001;16:1012-1019.

Lackner J, Schatzl G, Waldhor T, Resch K, Kratzik C, Marberger M. Constant decline in sperm concentration in infertile males in an urban population: experience over 18 years. Fert Ster. 2005;84:1657-1661.

Lipshultz L. «The debate continues»-the continuing debate over the possible decline in semen quality. Fert Ster. 1996;65:909-911.

Marimuthu P, Kapilashrami MC, Misro MM, Singh G. Evaluation of trend in semen analysis for 11 years in subjects attending a fertility clinic in India. Asian J Androl. 2003;5:221-225.

Mukhopadhyay D, Varghese A, Pal M, Banerjee S, Bhattacharyya A, Sharma S, Agarwal A. Semen quality and age-specific changes: a study between two decades on 3729 male partners of couples with normal sperm count and attending an andrology laboratory for infertility-related problems in an Indian city. Fert Ster. 2010;93:2247-2254.

Paulsen CA, Berman NG, Wang C. Data from men in greater Seattle area reveals no downward trend in semen quality is not geographically uniform. Fert Ster. 1996;65:1015-1020.

Perrard MH, Prisant N, Geoffroy-Siraudin C, Segretain D, Pointis G, Guichaoua MR, Durand P. Analysis of the intratesticular control of spermatogenesis by ex-vivo approaching. Folia Histol Cytobiol. 2009;7:1-6.

Rasmussen PE, Erb K, Westergaard LG, Laursen SB. No evidence for decreasing semen quality in four birth cohorts of 1055 Danish men born between 1950 and 1970. Fert Ster. 1997;68:1059-1064.

Seo JT, Rha K, Park YS, Lee MS. Semen quality over a 10 year period in 22249 men in Korea. Int J of Androl. 200;3:194-198.

Sharpe RM and Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? Lancet. 1993;341:1392-1395.

Shine R, Peek J, Birdsall M. Declining sperm quality in new Zealand over 20 years. N Z Med J. 2008;121:50-56.

Spirada S, Fonseca S, Lee A, Harrild K, Giannaris D, Mathers E, Bhattacharya S. Trends in semen parameters in the northeast of Scotland. J of Andrology. 2007;28:313-319.

Te Velde E, Burdof A, Nieschlag E, Eijkemens R, Kremer JAM, Roeleveld N, Habbema D. Is human fecundity declinig in Western countries? Human Reprod. 2010;25:1348-1353.

Van Waeleghem K, De Clercq N, Vermeulen L, Schoonjans F, Comhaire F. Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men. Hum Reprod. 1996;11:325-329.

World Health Organization WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and semen cervical mucus interaction. Cambridge University press, Cambridge UK, 1992, 1999.

FIGURES LEGENDS

Figure 1:

Linear regression lines of the means per year of the main sperm parameters.

For each parameter, the graph shows the linear regression line with 95% confidence interval over the study period. Significant decreases in the mean sperm concentration (A), the mean total sperm count per ejaculate (B), the rapid motility (C) and the normal morphology (D) are observed. For the morphology, results are showed until the end of 2002. The percentage per year of semen samples with azoospermia (E), allotted in group 4, increases significantly with time.

M = million.

Figure 2 :

Linear regression lines of the mean per year of morphological abnormalities which change significantly. For each parameter, the graph shows the linear regression line with 95% confidence interval over the study period. For the percentage of spermatozoa with bent tail, results are showed until the end of 2002

A: amorphous head; - B: multiple head; - C: bent tail; - D: tailless head; - E: headless tail; - F: multiple tail; - G: short tail; - H: cytoplasmic droplet.

LEGEND OF THE TABLES

Table 1:

Semen characteristics of 11 330 men consulting for infertility in our centre between 1988 and 2007.

The median and IQR (InterQuartile Range) are presented for sperm concentration, total sperm count and rapid motility. The mean and SD (Standard Deviation) are presented for normal forms until 2002. Rates of decrease per year for each parameter appear at the bottom of the table.

M/ml: Million per millilitre; M/ej: Million per ejaculate.

Figure 1:

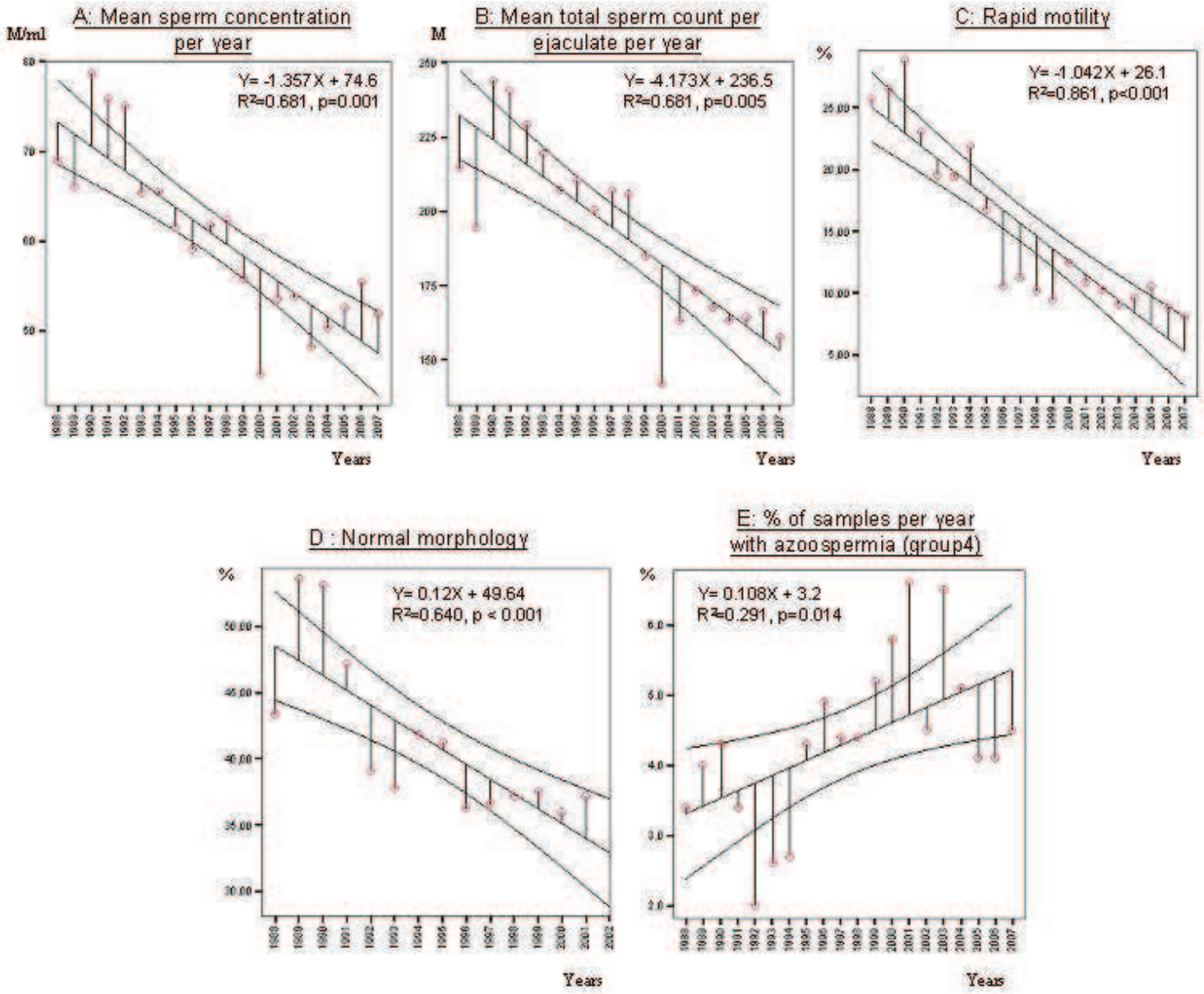

A: Mean sperm concentration per year
M/ml
Y= -1.357X + 74.6
R²=0.681, p=0.001
Years
B: Mean total sperm count per ejaculate per year
M
Y= -4.173X + 236.5
R²=0.681, p=0.005
Years
C: Rapid motility
%
Y= -1.042X + 26.1
R²=0.861, p<0.001
Years
D : Normal morphology
%
Y= 0.12X + 49.64
R²=0.640, p < 0.001
Years
E: % of samples per year with azoospermia (group4)
%
Y= 0.108X + 3.2
R²=0.291, p=0.014
Years

Figure 2:

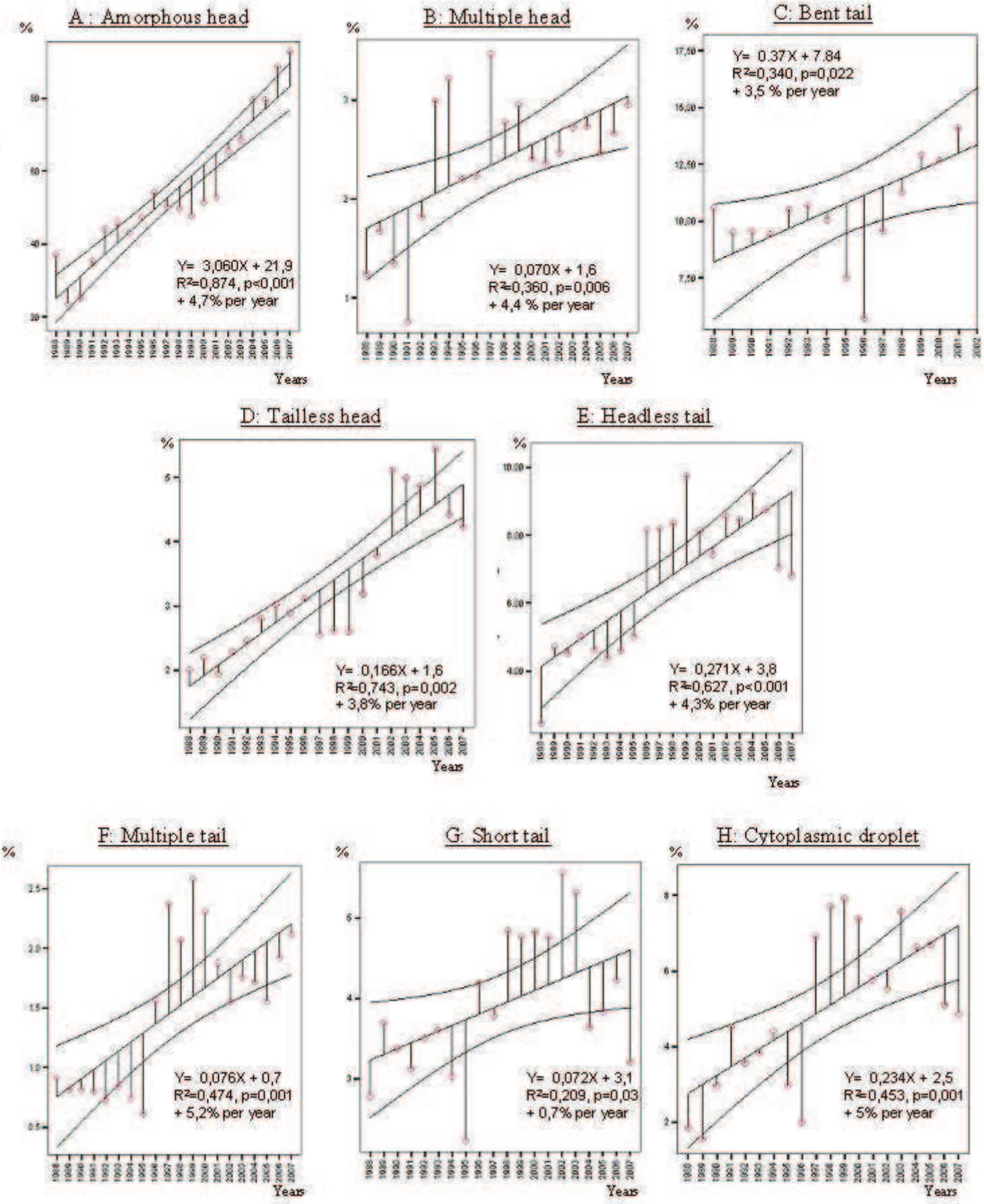

A : Amorphous head
%
Y= 3,060X + 21,9
R²=0,874, p<0,001
+ 4,7% per year
Years
B: Multiple head
%
Y= 0,070X + 1,6
R²=0,360, p=0,006
+ 4,4 % per year
Years
C: Bent tail
%
Y= 0.37X + 7.84
R²=0,340, p=0,022
+ 3,5 % per year
Years
D: Tailless head
%
Y= 0,166X + 1,6
R²=0,743, p=0,002
+ 3,8% per year
Years
E: Headless tail
%
Y= 0,271X + 3,8
R²=0,627, p<0.001
+ 4,3% per year
Years
F: Multiple tail
%
Y= 0,076X + 0,7
R²=0,474, p=0,001
+ 5,2% per year
Years
G: Short tail
%
Y= 0,072X + 3,1
R²=0,209, p=0,03
+ 0,7% per year
Years
H: Cytoplasmic droplet
%
Y= 0,234X + 2,5
R²=0,453, p=0,001
+ 5% per year
Years

Table 1: Semen characteristics of 11 330 men consulting for infertility between 1988 and 2007.

Years	*Number of samples*	*Sperm concentration (M/ml)* Median (IQR 25-75)	*Total sperm count (M/ej)* Median (IQR 25-75)	*Rapid motility (%)* Median (IQR 25-75)	*Normal forms (%)* Mean (+ SD)
1988	116	42.9 (10.9-81.2)	113,1 (34.9-304.1)	20 (0-50)	43.4 ± 9.2
1989	377	41.0 (11.8-87.6)	127.9 (33.2-278.8)	30 (10-40)	53.6 ± 17.5
1990	526	47.6 (14.4-111.1)	143.8 (44.4-348.5)	30 (10-40)	53.1 ± 16.4
1991	582	51.6 (13.7-114.4)	155.3 (35-364.2)	20 (10-40)	47.2 ± 17.4
1992	599	45.2 (13.6-98)	141.0 (38.1-311)	20 (10-30)	39.1 ± 17.3
1993	624	38.8 (11.4-89.5)	130.2 (35.8-304.4)	20 (10-30)	37.8 ± 17.7
1994	786	43.5 (11.4-93)	131.0 (35.7-290.6)	20 (10-30)	41.8 ± 18.7
1995	815	35.0 (7.2-88)	119.4 (25.7-295.6)	10 (5-30)	41.3 ± 18.4
1996	933	30.8 (6.5-84)	107.5 (18.6-285.9)	10 (0-20)	36.2 ± 17.6
1997	1257	35.0 (8.3-86.8)	111.6 (23.9-294.1)	10 (0-20)	36.6 ± 16.2
1998	1169	38.0 (8.3-88.7)	111.7 (22.4-299.1)	10 (0-20)	37.2 ± 17.3
1999	1186	31.0 (5.4-79.7)	99.5 (16.5-261.9)	5 (0-10)	37.5 ± 18.1
2000	1190	22.6 (4.7-65.5)	72.4 (12.2-222.5)	10 (0-20)	35.9 ± 18.1
2001	1280	27.3 (5.4-75.6)	84 (16.2-242.9)	10 (0-20)	37.1 ± 19.5
2002	1157	30.0 (5.1-79.6)	93.1 (16.3-247.8)	10 (0-20)	32.5 ± 19.1
2003	1082	27.6 (5.2-70.5)	87.2 (14.8-243.9)	10 (0-15)	
2004	1000	29.3 (5-76.4)	88.0 (16.1-242.7)	10 (0-20)	
2005	1061	27.0 (5.8-76.9)	83.2 (17-245.4)	10 (0-20)	
2006	1015	34.8 (7.5-82.6)	98.4 (21.8-243.2)	5 (0-10)	
2007	1114	31.7 (7.8-71.9)	94.7 (21.4-228.2)	5 (0-10)	
Rates of decrease per year		1.4%	1.5%	5.6%	1.9%

Not available

DEUXIEME PARTIE

Impact des métaux lourds sur la spermatogenèse du rat ex-vivo

I- Validation du modèle de culture de tubes séminifères de rat comme nouvel outil de reprotoxicologie

1- Intérêt du modèle

Dans le contexte actuel, la communauté scientifique a besoin de nouveaux outils pour clarifier les mécanismes d'action des toxiques qui nous entourent sur la fertilité masculine. L'exploration in vivo, très consommatrice en animaux, est rendue difficile dans un environnement où les hormones endogènes co-existent avec les composés chimiques et/ou pharmaceutiques étudiés. Les études in vitro réalisées jusqu'ici ont utilisé principalement des cultures primaires de cellules somatiques testiculaires (cellules de Leydig ou cellules de Sertoli) ou des lignées représentatives de ces cellules. Toutefois, de tels systèmes ne permettent pas d'étudier les effets de composés potentiellement toxiques sur la spermatogenèse. Peu d'études ont utilisé des incubations à court terme de cellules germinales, cultivées seules ou en présence de cellules de Sertoli, car la faible durée de vie de ces cultures réduit grandement leur utilité (Pineau et coll. 1999). 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 fertilité masculine (Delbès et coll. 2005). C'est pourquoi, des systèmes de culture organotypique de fragments de testicules fœtaux humains ou de rongeurs ont été développés (Lambrot et coll. 2006). 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 3 à 5 jours, les effets de substances sur le développement précoce du testicule et sur les gonocytes (Chauvigné et coll. 2009, Lambrot et coll. 2009). Outre que la disponibilité du tissu humain peut limiter une utilisation à grande échelle, ces systèmes ne renseignent pas sur les effets éventuels des molécules auxquelles l'individu serait exposé plus

tardivement, et qui pourraient altérer les différents types de cellules germinales qui se mettent en place au cours des phases de développement néonatal (spermatogonies), prépubertaire (spermatocytes), et pubertaires (spermatides et spermatozoïdes), ou les relations entre cellules testiculaires différenciées.

Notre modèle de culture de tubes séminifères de rat en chambre bicamérale permet d'étudier les 3 étapes de la spermatogenèse: la phase de multiplication goniale, la méiose dans son intégralité et les premières étapes de la spermiogenèse; au cours d'une période de 4 semaines de culture (Hue et coll. 1998, Staub et coll. 2000). Durant les 12 dernières années, le modèle a été consciencieusement validé sur de nombreux points de la physiologie (pour revue, Perrard et coll. 2009). Dans notre travail, nous montrons que ce modèle de culture est parfaitement adapté à des études toxicologiques grâce à l'ajout du toxique à tester dans le compartiment basal. Cela permet de mimer ce qui pourrait se passer in vivo lorsque le toxique doit traverser barrière hémotesticulaire avant d'atteindre les cellules germinales en différenciation.

2- Description de la méiose in vivo

La première partie de notre travail a consisté à décrire en immunocytochimie grâce à l'anticorps anti-SCP3 la prophase de première division méiotique chez le rat in vivo. Nous avons choisi d'étudier la méiose :

- chez le rat impubère de 23 jours, utilisé pour les cultures
- chez le rat de 42 jours, âge correspondant grossièrement à celui atteint au terme des 2 semaines de culture
- et chez le rat adulte (100 jours).

Chez le rat adulte nous avons pu décrire très précisément les aspects des différents stades de prophase de première division méiotique: leptotène, zygotène, pachytène, et diplotène. Nos

résultats sont cohérents avec ceux de Clermont et Perey (1957), Clermont (1972) et Scherthan et Schönborn (2001). Nous avons pour les 3 âges étudiés, établis les pourcentages respectifs des différents stades et décrit les anomalies rencontrées in vivo dans les noyaux des spermatocytes au stade pachytène.

Chez le rat impubère de 23 jours, les spermatocytes au stade leptotène sont significativement plus nombreux que chez l'adulte (18% versus 2.3%, $p< 0.001$). Inversement, les noyaux au stade diplotène sont significativement moins fréquents chez le rat impubère que chez l'adulte (1.2% versus 6.5%, $p< 0.001$). Cette observation témoigne de l'immaturité de la spermatogenèse à cet âge chez le rat. Nous ne retrouvons pas de différence significative pour les stades zygotène et pachytène. Chez le rat de 42 jours, le pourcentage de spermatocytes au stade diplotène est très supérieur à celui des 2 autres âges étudiés (16%, $p<0.001$), ce qui peut s'expliquer par le développement progressif de la spermatogenèse chez le jeune rat chez qui elle n'est pas encore parfaitement efficace et aboutit à l'accumulation de stades intermédiaires. Ce travail nous a permis de montrer que les pourcentages de spermatocytes aux différents stades de prophase I chez le rat de 42 jours sont très proches de ceux obtenus après 16 jours de culture. Ce parallèle in vivo-ex vivo renforce la pertinence du modèle.

L'analyse qualitative des spermatocytes au stade pachytène montre que les principales anomalies retrouvées sont les mêmes que lors de nos précédent travaux chez l'homme (Geoffroy et coll. 2007, Tassistro et coll. 2009) : fragmentation des CS, asynapsis et images en pointillés. L'anomalie la plus fréquemment retrouvée chez le rat est la fragmentation des CS : 9.3% chez le rat adulte, 8.5% à 42 jours et 10.5% à 23 jours. Les asynapsis, limités et touchant peu de bivalents, sont moins fréquents: 4.2% chez le rat adulte, 3.9% à 42 jours et 3.7% à 23 jours. Les pourcentages de ces 2 anomalies ne sont pas significativement différents selon l'âge étudié. Enfin, le pourcentage de noyaux présentant des images « en pointillé » est

significativement plus élevé chez le rat impubère qu'à 42 jours ou à qu'à l'âge adulte (3.5% versus 0.6% et 0.4% respectivement, $p< 0.001$).

3- Cinétique de différenciation des cellules en culture grâce à la bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

Nous avons réalisé 2 cultures en présence de BrdU afin de décrire le profil de différenciation des cellules germinales en culture grâce à un double marquage BrdU-SCP3.
La bromo-2'-deoxyuridine est un intercalant de l'ADN. Elle a été ajoutée juste après la mise en culture des tubes séminifères et laissée pendant 20 heures, ce qui correspond grossièrement à la durée de la phase S préméiotique chez le rat. La cellule germinale incorpore le BrdU lors de sa synthèse d'ADN, soit lors des mitoses goniales, soit lors du stade pré-leptotène. Nous pouvons ensuite révéler ce marquage par un anticorps anti-BrdU et suivre au fil des jours les cellules marquées qui se seront différenciées durant le processus de culture. Cela nous permet dans un premier temps de valider le modèle de culture et d'établir le profil d'apparition des différents stades aux jours de culture sélectionnés. Nous pouvons définir avec précision le jour d'apparition du pic d'un stade donné et par comparaison entre les cultures témoins et celles en présence de chrome, mettre en évidence un possible retard voire un blocage dans le processus méiotique. Nous ne parvenons à mettre en évidence qu'un faible pourcentage de cellules marquées (7.5%) mais le nombre total de noyaux BrdU positifs reste suffisant pour interpréter nos résultats. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation de la formamide dans l'étape de dénaturation (au lieu de la soude dans les travaux de Staub et coll. (2000), imposée par la nécessité de protéger le marquage SCP3. L'apparition séquentielle des différents stades de spermatocytes doublement marqués en SCP3-BrdU du préleptotène au diplotène, confirme que le comportement des cellules méiotiques en culture est très proche de ce qui se déroule in vivo.

Une fois ce travail réalisé, les cultures suivantes avec et sans chrome ont été réalisées sans BrdU afin d'évaluer exclusivement l'effet du chrome sur les cellules germinales. Le BrdU étant lui–même intercalant de l'ADN et donc génotoxique, les résultats observés pourraient résulter de l'interaction du chrome et du BrdU rendant l'interprétation difficile pour la toxicité du chrome en lui-même.

Analysis of the intratesticular control of spermatogenesis by ex-vivo approaching

Perrard MH, Prisant N, Geoffroy-Siraudin C,

Segretain D, Pointis G, Guichaoua MR, Durand Ph

Folia Histochemica et Cytobiologica, 2009, 47(5): 89-94

FOLIA HISTOCHEMICA
ET CYTOBIOLOGICA
Vol. 47, No. 5, 2009
pp. S89-S94

Analysis of the intratesticular control of spermatogenesis by *ex-vivo* approaching

Marie-Hélene Perrard[1], Nadia Prisant[2], Cendrine Geoffroy-Siraudin[3], Dominique Segretain[2], Georges Pointis[2], Marie-Roberte Guichaoua[3], Philippe Durand[1]

[1]Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Université de Lyon, Université Lyon I; CNRS; INRA; Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France
[2]INSERM U 895, Team 5 "Physiopathology of germ cell control: genomic and non genomic mechanisms" C3M, Nice and Université de Paris Descartes, Paris, France
[3]Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Hôpital de la Conception, Baille Marseille, France

Abstract: Spermatogenesis involves the realization of a particular genetic program which requires a specific environment ("niche"). Multiplication, differentiation and apoptosis of male germ cells are finely regulated by pituitary hormones (mainly LH and FSH), and by a complex network of factors originating from both the somatic cells and the germ cells of the testis. It is becoming clear that hormones and intra-testicular regulatory factors can compensate, at least in part, for the absence of some hormones or factors including FSH and LH or androgen receptors. Since, most of the growth factors, cytokines and neurotrophins produced within the testis are widely expressed in the organism, the attempts to understand their role in spermatogenesis by "classical" knock-out strategies have been often disappointing. Therefore an important aspect of our previous work was to settle and characterize carefully two systems of cocultures of testicular germ cells with somatic cells in bicameral chambers. For instance, we showed for the first time that the whole meiotic step could be performed *in vitro* in a mammalian species (the rat). Moreover, all our data indicate that our co-culture systems enable to highlight mechanisms pertinent to the physiological processes. Sperm parameters have been deteriorated considerably during the past 4-5 decades. There is now evidence that chemical exposure is at least partly responsible for these testicular diseases. If a large number of environmental pollutants are able to affect male fertility and to exert carcinogenic effects, their cellular and molecular mechanisms are still unidentified. The cultures in bicameral chambers that we settled can be used to study the effects of a toxicant when added in the basal compartment of the culture chamber, which appears relevant to the *in vivo* situation. Taken together our results indicate that our *in vitro* culture systems, which allow screening for the effect of biological activity of different physiological factors, can be also helpful to study that of any chemicals on both survival and multiplication/differentiation of somatic and/or spermatogenic cells on a relatively long time period.

Key words: spermatogenesis, germ cell culture, testicular regulations, testicular toxicology

Introduction

Spermatogenesis involves the realization of a particular genetic program that requires a specific environment ("niche"). Multiplication, differentiation and apoptosis of male germ cells are finely regulated by pituitary hormones, mainly LH and FSH [1], and by a complex network of factors originating from both the somatic cells and the germ cells of the testis [2], as well as by direct communications between supporting somatic Sertoli cells and germ cells [3].

It is becoming clear that hormones and intra-testicular regulatory factors can compensate, at least in part, for the absence of some hormones or factors including FSH [4-6] and androgen [7-10], or luteinizing hormone [11] receptors. Since most of the factors produced within the testis are also widely expressed in other organs, the attempts to understand their role in spermatogenesis by conventional knockout (KO) strategies have been limited. Some mice die shortly

Correspondance: P. Durand, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, INRA, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France; tel.(+33 (0)4 72 72 89-65); fax. (+33 (0)4 72 72 89 92), e-mail: philippe.durand@ens-lyon.fr

©Polish Histochemical et Cytochemical Society
Folia Histochem Cytobiol. 2009;47(5): S89 (S89-S94)
10.2478/v10042-009-0061-8

SOME RIGHTS RESERVED

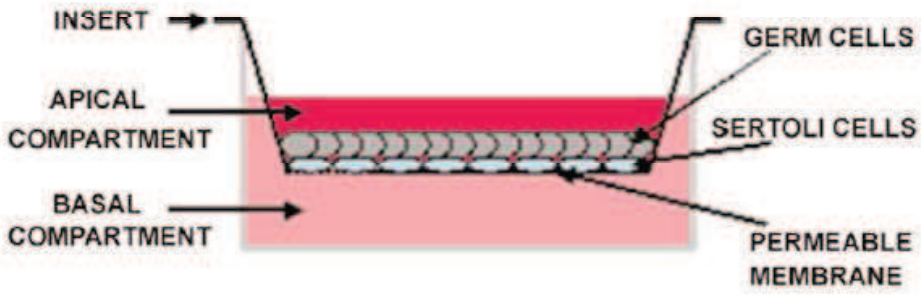


Fig. 1. Culture system of germ cells together with Sertoli cells, in bicameral chambers.

after birth (*e.g.* KO of insulin-like growth factor-I, IGF-I, [12]; transforming growth factor β (TGF-β) [13]; nerve growth factor (NGF) [14], or they do not exhibit any particular phenotype on male fertility (*e.g.* KO of IGF-II, IGF-binding protein-2 to -6 (IGFBP-2 to -6) [15]. Moreover, even if for some of these factors produced by, and acting on, testicular cells, KO models or spontaneous genetic defects have allowed to understand their role on the early steps of spermatogenesis (*e.g.* stem cell factor (SCF) [16], Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) [17], their action, if any, on later steps of spermatogenesis could not be studied since invalidation of these genes results in an early blockade of the spermatogenic process. In addition, ubiquitous factors (such as IGF-I, TGF-β) may be expressed by several cell types in the testis and their role can change during development and spermatogenesis [18].

Physiological studies in *ex-vivo* models

Therefore, an important aspect of our work, over the past twelve years, was to settle and characterize carefully two systems of co-cultures of testicular germ cells with somatic cells in bicameral chambers (Fig.1), in a defined culture medium, which maintain the blood testis barrier (Figs. 2, 3) and enable to study the regulations involved in the mitotic phase and the meiotic phase of spermatogenesis, and the early steps of spermiogenesis over a 4-week culture period in the rat. In the first system, elutriated spermatogonia/early spermatocytes, pachytene spermatocytes or round spermatids are cultured on a monolayer of Sertoli cells, whereas in the other system, small pieces of seminiferous tubule segments are seeded [19-21]. In these systems, it is indeed possible to study: 1) the physiology of the blood-testis barrier; 2) survival / death of somatic and/or germ cells, proliferation of Sertoli cells and spermatogonia; 3) the course of meiotic divisions (key stage of spermatogenesis during which genetic recombinations occur); 4) the cytogenetic features of germ cells; 5) the expression of specific genes in the germ cells or Sertoli cells; 6) the peptide profiling of the culture supernatant/cultured cells.

An important aspect of the results obtained using *in vitro/ex-vivo* models is their relevance to the *in vivo* physiological situation. The germ cell/Sertoli cell coculture systems that we settled [19-21] have been carefully validated from the physiological point of view, on many aspects, over the last twelve years. To our knowledge, there is no other system of culture of male germ cells and Sertoli cells which has been so carefully and extensively validated.

We were the first to show that the whole meiotic process could occur *in vitro* in a mammal, the rat [22]. This was ascertained by cytological and cytometrical analyses and by the expression of germ cell specific genes. We showed subsequently that the development of the meiotic step, *in vitro*, in the testis of pubertal rats was close to what happens *in vivo* when considering the changes in the cell populations of different ploidy, the gene expression of germ cells, the kinetics of differentiation of BrdU-labeled early or middle pachytene spermatocytes and the levels of apoptosis in the different cell populations, even if the rate of *in vitro* differentiation of BrdU-labeled spermatocytes slowed down when reaching the stage of middle pachytene spermatocyte [23]. More recently, we also demonstrated that there was no significant difference between the percentages of leptotene, zygotene, pachytene, and diplotene stages in 42 day-old rats and on day 16 of culture of testes from 23 day-old rats (Fig. 4), indicating a similar development *in vivo* and *in vitro* (Geoffroy-Siraudin *et al* submitted).

Our findings also showed that FSH and testosterone have positive and somewhat overlapping effects on the meiotic divisions and the post-meiotic expression of a germ cell-specific gene (transition protein1: TP1), effects which cannot be related solely to their ability to reduce germinal cell apoptosis [24].These results have been recently confirmed by others using KO mouse models [8,9,25].

Recently we have reported that NGF and its two receptors are similarly expressed *in vivo* and under our culture conditions and that both NGF and TGF-β are able to regulate negatively the second meiotic division of rat spermatocytes [26, 27]. More recently we have demonstrated that NGF and TGFβ have a totally

©Polish Histochemical et Cytochemical Society
Folia Histochem Cytobiol. 2009;47(5): S90 (S89-S94)
10.2478/v10042-009-0061-8

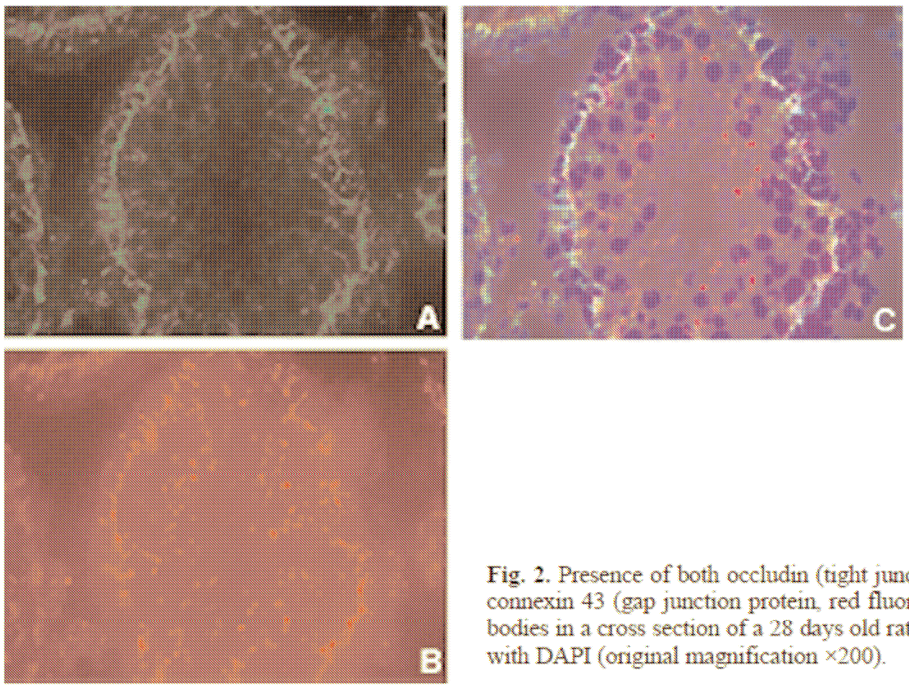


Fig. 2. Presence of both occludin (tight junction protein, green fluorescence) (**A**) and connexin 43 (gap junction protein, red fluorescence) (**B**), detected with specific antibodies in a cross section of a 28 days old rat testis. (**C**) merge; the nuclei were stained with DAPI (original magnification ×200).

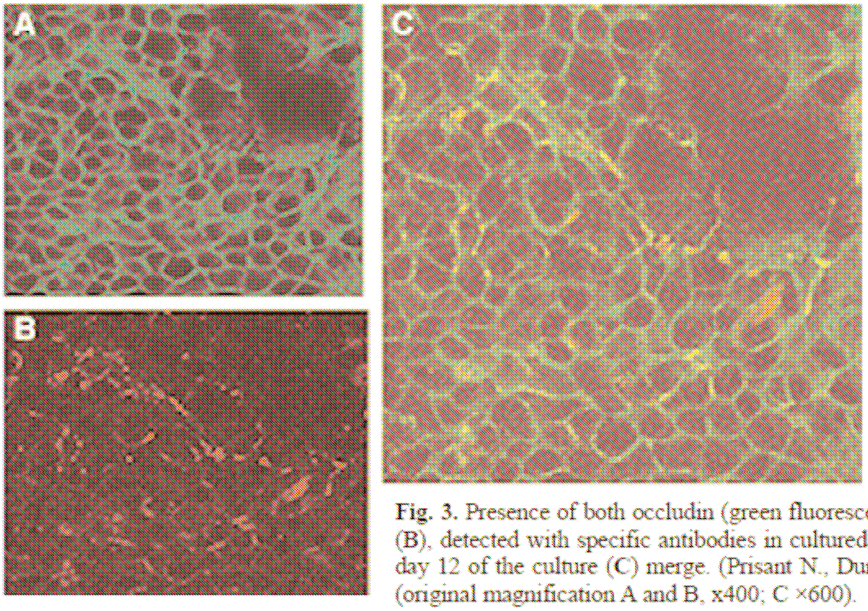


Fig. 3. Presence of both occludin (green fluorescence) (**A**), and connexin 43 (red fluorescence) (**B**), detected with specific antibodies in cultured seminiferous tubules from 20days old rats at day 12 of the culture (**C**) merge. (Prisant N., Durand P. Segretain D., Pointis G. unpublished). (original magnification A and B, x400; C ×600).

redundant (without additivity) effect on this step (Perrard MH and Durand P 2009 in press). This result offers an explanation to the study of Ingman and Robertson [28], with null mutant mice for TGF-β1, claiming that their data conflicted with conclusions from *in vitro* culture experiments that TGFβ1 might act to impair spermatocyte progression through the second meiotic division [26]. Indeed, these authors did not observe a change at this level in their mouse model, but it must be emphasized that male gametes synthesize TGFβ1 with greatest abundance detected in spermatocytes and early round spermatids [29], *i.e* precisely, the same germ cell types which synthesize β-NGF [27]. Therefore, it is reasonable to speculate that the absence of effect of TGFβ1 KO, reported by these authors, was due to the redundant effect of β-NGF on that step.

We have shown that *in vitro* meiotic progression of rat spermatocytes requires mitogen-activated protein kinases of Sertoli cells and close contacts between the germ cells and the Sertoli cells [30]. Now, connexin 43 is detected between spermatocytes and Sertoli cells in our cultures. These results fit with a recent study [31] showing that replacement of connexin 43 by connexin

©Polish Histochemical et Cytochemical Society
Folia Histochem Cytobiol. 2009:47(5): S91 (S89-S94)
10.2478/v10042-009-0061-8

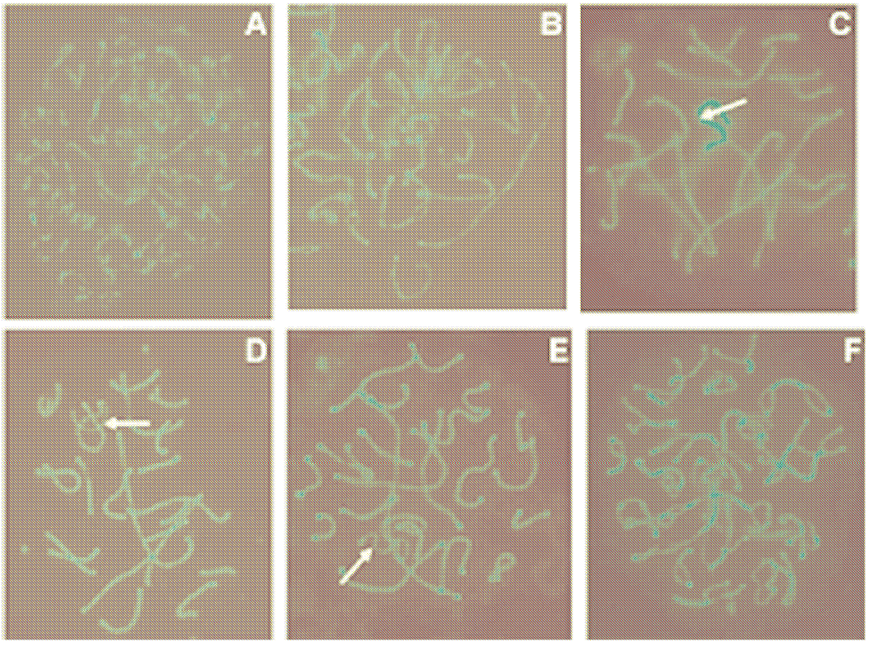


Fig. 4. The different sub-stages of meiotic prophase I in seminiferous tubule cultures: an anti-SCP3 antibody was used to reveal axial elements and lateral elements of synaptonemal complexes. Arrows show different configurations of the sex chromosomes. (**a**) leptotene spermatocyte; (**b**) zygotene spermatocyte; (**c, d, e**) pachytene spermatocyte; (**f**) diplotene spermatocyte. (Geoffroy-Siraudin C, Durand P, Guichaoua MR unpublished) (original magnification ×1000).

26 in transgenic mice impairs spermatogenesis leading to the absence of germ cells beyond spermatocytes type I. Other studies in our laboratory demonstrated that both meiotic divisions are blocked by pharmacological inhibitors of MPF [32], as could be expected [33]. On the mitotic step of spermatogenesis, we have got results consistent with a role of GDNF in inhibiting the S-phase entrance of a large subset of differentiated type A spermatogonia, together with an enhancing effect of the factor on a small population of undifferentiated (stem cells) spermatogonia [34]. Actually, these studies fit quite well with the results of *in vivo* studies [17,35-37]. Further, we have recently shown that Cx43 gap junctions between Sertoli cells participate in the control of Sertoli cell proliferation and that Cx43 gap junctions between Sertoli cells and spermatogonia are indirectly involved in germ cell number increase by controlling germ cell survival rather than germ cell proliferation [38]. Similar results were obtained by the observation of Sertoli cell conditional Cx43 KO mice demonstrating that Cx43 is essential for control of Sertoli cell proliferation and differentiation [39,40].

Taken together, the above data reinforce the view that our co-culture systems enable to highlight mechanisms pertinent to the physiological processes.

Assessment of toxicological potency of chemicals

Sperm parameters have been deteriorated considerably during the past 4-5 decades. There is now evidence that chemical exposure is at least partly responsible for these testicular diseases. If a large number of environmental pollutants are able to affect male fertility and to exert carcinogenic effects, their cellular and molecular mechanisms are still unidentified. The cultures in bicameral chambers that we settled should be a major methodological breakthrough in assessing toxicological potency of chemical compounds on a relatively long time period and enabling the study of many aspects of their mechanism of action while reducing the number of animals needed. In these culture systems, testicular germ cells from one rat allow to perform ten to twenty different assays. It is noteworthy that our systems of culture in bicameral chamber allow studying the effects of a toxic substance added to the basal compartment of the culture chamber, and thus mimic what could happen *in vivo* in the testis. Indeed, the cellular junctions, between Sertoli cells and between Sertoli cells and germ cells, which are essential for spermatogenesis, are maintained or rebuilt in our systems of culture (see above). Therefore, before reaching the germ cells, in our systems, the toxic compounds must cross the barrier structured by Sertoli cells (principal component the blood-testis barrier). By contrast, in "conventional" cultures wells, a compound may be toxic to differentiated germ cells because it is placed directly in contact with these cells, whereas *in vivo*, it may not have access to the compartment of the seminiferous tubules where this population of germ cells is located. Furthermore, our cultures can be analyzed by cell physiology, cytology, biochemical and molecular biological approaches allowing the determination of the mechanisms responsible for the gonadal toxicity or carcinogenic effect of organic or mineral compounds and of nanoparticles. It should be emphasized that knowledge of the mode of action of the molecules studied can help to determine whether the obser-

©Polish Histochemical et Cytochemical Society
Folia Histochem Cytobiol. 2009;47(5): S92 (S89-S94)
10.2478/v10042-009-0061-8

vations made in animals are transferable to humans, which remains a major problem in this type of study.

Our co-culture systems can also serve as an original tool for rapid screening of molecules for therapeutic purposes in order to improve a failing male fertility. The use of a cell population exposed (lot) or not (control group) to the substance allows to get rid of much of the variability between animals that are encountered in testing *in vivo* and to optimize the power of the tests. In addition, the possibility of rather long term cultures of the cells will allow, most often, testing for the reversibility of the observed effects. Recently, we compared cultures of normal, and irradiated by gamma rays, germ cells. In spermatocytes for non-irradiated cultures, the comet assay revealed the presence of breaks of DNA, whose number decreased during the culture, indicating the involvement of mechanisms of DNA repair associated with meiotic recombination. In irradiated cells, the development of DNA strand breaks was heavily modified. Thus, our model is able to detect genotoxic lesions and / or abnormal DNA repairing [41].

By using these cultures, we have observed that chromium at low concentrations (1 µg/L) severely alters the synaptonemal complexes of the meiotic cells, and decreases by 40% the number of round spermatids formed in culture (Geoffroy-Siraudin *et al* submitted).

Taken together these results indicate that our *in vitro* culture systems, which allow screening for the effect of biological activity of different physiological factors, can be also helpful to study that of any chemicals (either alone or in combination with others) on both survival and multiplication/differentiation of somatic and/or spermatogenic cells on a relatively long time period.

References

[1] McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog. Horm. Res.* 2002;57:149-79.

[2] Huleihel M, Lunenfeld E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J. Androl.* 2004;6:259-68.

[3] Pointis G, Segretain D. Role of connexin-based gap junction channels in testis. *Trends Endocrinol. Metab.* 2005;16:300-6.

[4] Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, Huhtaniemi I, Knight PG, Charlton HM. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology.* 2000;141:1795-803.

[5] Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling *in vivo*: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998;95:13612-7.

[6] Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet.* 1997;15:201-4.

[7] Chang C, Chen YT, Yeh SD, Xu Q, Wang RS, Guillou F, Lardy H, Yeh S. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:6876-6881.

[8] De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lecureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:1327-1332.

[9] Holdcraft RW, Braun RE. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* 2004;131:459-467.

[10] Yeh S, Tsai MY, Xu Q, Mu XM, Lardy H, Huang KE, Lin H, Yeh SD, Altuwaijri S, Zhou X, Xing L, Boyce BF, Hung MC, Zhang S, Gan L, Chang C. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an *in vivo* model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:13498-503.

[11] Zhang FP, Pakarainen T, Poutanen M, Toppari J, Huhtaniemi I. The low gonadotropinindependent constitutive production of testicular testosterone is sufficient to maintain spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:13692-7.

[12] Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell.* 1993;75:59-72.

[13] Oshima M, Oshima H, Taketo MM. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol.* 1996;179:297-302.

[14] Tessarollo L. Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9:125-37.

[15] Chandrashekar V, Zaczek D, Bartke A. The consequences of altered somatotropic system on reproduction. *Biol Reprod.* 2004;71:17-27.

[16] Besmer P, Manova K, Duttlinger R, Huang EJ, Packer A, Gyssler C, Bachvarova RF. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl.* 1993:125-37.

[17] Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Saarma M, Sariola H. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science.* 2000;287:1489-93.

[18] Kierszenbaum AL. Mammalian spermatogenesis *in vivo* and *in vitro*: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocrine Rev.* 1994,15.116-134.

[19] Hue D, Staub C, Perrard-Sapori MH, Weiss M, Nicolle JC, Vigier M, Durand P. Meiotic differentiation of germinal cells in three-week cultures of whole cell population from rat seminiferous tubules. *Biol Reprod.* 1998;59:379-387.

[20] Marret C, Durand P. 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.* 2000;40:305-19.

[21] Weiss M, Vigier M, Hue D, Perrard-Sapori MH, Marret C, Avallet O, Durand P. Pre- and postmeiotic expression of male germ cell-specific genes throughout 2-week cocultures of rat germinal and Sertoli cells. *Biol Reprod.* 1997;57:68-76.

[22] Staub C, Hue D, Nicolle JC, Perrard-Sapori MH, Segretain D, Durand P. The whole meiotic process can occur *in vitro* in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp Cell Res.* 2000;260:85-95.

[23] Perrard MH, Hue D, Staub C, Le Vern Y, Kerboeuf D, Durand P. Development of the meiotic step in testes of pubertal rats: comparison between the *in vivo* situation and under *in vitro* conditions. *Mol Reprod Dev.* 2003;65:86-95.

©Polish Histochemical et Cytochemical Society
Folia Histochem Cytobiol. 2009:47(5): S93 (S89-S94)
10.2478/v10042-009-0061-8

[24] Vigier M, Weiss M, Perrard MH, Godet M, Durand P. The effects of FSH and of testosterone on the completion of meiosis and the very early steps of spermiogenesis of the rat: an *in vitro* study. *J Mol Endocrinol*. 2004;33:729-42.
[25] Abel MH, Baker PJ, Charlton HM, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Guillou F, O'Shaughnessy PJ. Spermatogenesis and sertoli cell activity in mice lacking Sertoli cell receptors for follicle-stimulating hormone and androgen. *Endocrinology*. 2008;149:3279-85.
[26] Damestoy A, Perrard MH, Vigier M, Sabido O, Durand P. Transforming growth factor beta-1 decreases the yield of the second meiotic division of rat pachytene spermatocytes *in vitro*. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:22.
[27] Perrard MH, Vigier M, Damestoy A, Chapat C, Silandre D, Rudkin BB, Durand P. Betanerve growth factor participates in an auto/paracrine pathway of regulation of the meiotic differentiation of rat spermatocytes. *J Cell Physiol*. 2007;210:51-62.
[28] Ingman WV, Robertson SA. Transforming growth factor-beta1 null mutation causes infertility in male mice associated with testosterone deficiency and sexual dysfunction. *Endocrinology*. 2007;148:4032-43.
[29] Teerds KJ, Dorrington JH. Localization of transforming growth factor beta 1 and beta 2 during testicular development in the rat. *Biol Reprod*. 1993;48:40-5.
[30] Godet M, Sabido O, Gilleron J, Durand P. Meiotic progression of rat spermatocytes requires mitogen-activated protein kinases of Sertoli cells and close contacts between the germ cells and the Sertoli cells. *Dev Biol*. 2008;315:173-88.
[31] Winterhager E, Pielensticker N, Freyer J, Ghanem A, Schrickel JW, Kim JS, Behr R, Grummer R, Maass K, Urschel S, Lewalter T, Tiemann K, Simoni M, Willecke K. Replacement of connexin43 by connexin26 in transgenic mice leads to dysfunctional reproductive organs and slowed ventricular conduction in the heart. *BMC Dev Biol*. 2007;7:26.
[32] Godet M, Damestoy A, Mouradian S, Rudkin BB, Durand P. Key role for cyclindependent kinases in the first and second meiotic divisions of rat spermatocytes. *Biol Reprod*. 2004;70:1147-52.
[33] Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martin A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet*. 2003;35:25-31.
[34] Fouchécourt S, Godet M, Sabido O, Durand P. Glial cell-line-derived neurotropic factor and its receptors are expressed by germinal and somatic cells of the rat testis. *J Endocrinol*. 2006;190:59-71.
[35] Creemers LB, Meng X, den Ouden K, van Pelt AM, Izadyar F, Santoro M, Sariola H, de Rooij DG. Transplantation of germ cells from glial cell line-derived neurotrophic factoroverexpressing mice to host testes depleted of endogenous spermatogenesis by fractionated irradiation. *Biol Reprod*. 2002;66:1579-84.
[36] Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A, Nishimune Y. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech Dev*. 2002;113:29-39.
[37] Yomogida K, Yagura Y, Tadokoro Y, Nishimune Y. Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. *Biol Reprod*. 2003;69:1303-7.
[38] Gilleron J, Carette D, Durand P, Pointis G, Segretain D. Connexin 43 a potential regulator of cell proliferation and apoptosis within the seminiferous epithelium. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:1381-90.
[39] Brehm R, Zeiler M, Ruttinger C, Herde K, Kibschull M, Winterhager E, Willecke K, Guillou F, Lecureuil C, Steger K, Konrad L, Biermann K, Failing K, Bergmann M. A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *Am J Pathol*. 2007;171:19-31.
[40] Sridharan S, Simon L, Meling DD, Cyr DG, Gutstein DE, Fishman GI, Guillou F, Cooke PS. Proliferation of adult sertoli cells following conditional knockout of the Gap junction-alprotein GJA1 (connexin 43) in mice. *Biol Reprod*. 2007;76:804-12.
[41] Perrin J, Lussato D, De Meo M, Durand P, Grillo JM, Guichaoua MR, Botta A, Berge-Lefranc JL. Evolution of DNA strand-breaks in cultured spermatocytes: the Comet Assay reveals differences in normal and gamma-irradiated germ cells. *Toxicol. In vitro* 2007;21:81-89.

©Polish Histochemical et Cytochemical Society
Folia Histochem Cytobiol. 2009:47(5): S94 (S89-S94)
10.2478/v10042-009-0061-8

Analyse de la spermatogenèse ex-vivo

Application à l'analyse de la toxicité testiculaire

Perrard MH, Grenet C, Prisant N, Geoffroy-Siraudin C,

Segretain D, Guichaoua MR, Pointis G, Durand Ph

Médecine Sciences, 2010, 26:305-310

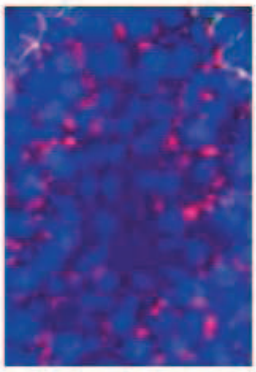
MEDECINE/SCIENCES 2010 ; 26 : 305-10

Analyse de la spermatogenèse *ex vivo*

Application à l'analyse de la toxicité testiculaire

Marie-Hélène Perrard, Christophe Grenet, Nadia Prisant, Cendrine Geoffroy-Siraudin, Dominique Segretain, Marie-Roberte Guichaoua, Georges Pointis, Philippe Durand

› Un des enjeux de la réglementation européenne REACH est l'amélioration des connaissances des propriétés chimiques, toxiques et écotoxiques des substances utilisées dans la vie courante. Concernant la toxicité testiculaire, nous manquons de modèles pertinents et les rares modèles *in vivo* utilisés ne sont pas toujours appropriés pour des études mécanistiques. Notre laboratoire a développé des systèmes de culture des cellules germinales mâles, en chambre bicamérale, qui reproduisent une barrière hématotesticulaire et permettent d'étudier le mécanisme d'action des régulateurs physiologiques et les effets d'une substance toxique sur la spermatogenèse, tout en réduisant le nombre d'animaux requis. ‹



M.H. Perrard, C. Grenet, P. Durand : Institut de génomique fonctionnelle de Lyon, Université Lyon I ; CNRS ; Inra ; École normale supérieure de Lyon, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France. Philippe.Durand@ens-lyon.fr
N. Prisant, D. Segretain, G. Pointis : Inserm U 895, Équipe 5 Physiopathology of germ cell control: genomic and non genomic mechanisms C3M, Université de Nice Sophia Antipolis, Université Paris Descartes, 45, rue des Saints-Pères, Paris, France.
C. Geoffroy-Siraudin, M.R. Guichaoua : Laboratoire de biologie de la reproduction, Hôpital de la conception, 147, boulevard Baille, Marseille ; Laboratoire de biogénotoxicologie et mutagenèse environnementale (EA1784), ECCOREV FR 3098 Aix-Marseille Université/CNRS, France.

Les enjeux de la toxicologie testiculaire

Plusieurs études 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, cancers, cryptorchidie, hypospadias) 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 ces 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 en plus, les études de toxicologie font appel à la toxicogénomique, appliquée à des lignées de cellules en culture, pour identifier les gènes dont l'expression est modifiée par les toxiques. Cependant, cette approche n'est pas applicable à une étude toxicologique du fonctionnement testiculaire - toxicologie testiculaire - car il n'y a pas de lignée de cellules germinales « modèle » puisque la différenciation des cellules germinales est dépendante d'interactions avec les cellules somatiques du testicule.

Les études *in vitro* réalisées jusqu'ici ont utilisé principalement des cultures primaires de cellules somatiques testiculaires (cellules de Leydig ou cellules de Sertoli) ou des lignées représentatives de ces cellules. Toutefois, de tels systèmes ne permettent pas d'étudier les effets de composés potentiellement toxiques sur la spermatogenèse. Peu d'études ont utilisé des incubations à court terme de cellules germinales, cultivées seules ou en présence de cellules de Sertoli, car la faible durée de vie de ces cultures réduit grandement leur utilité [2].

02/03/2010 13:50:02

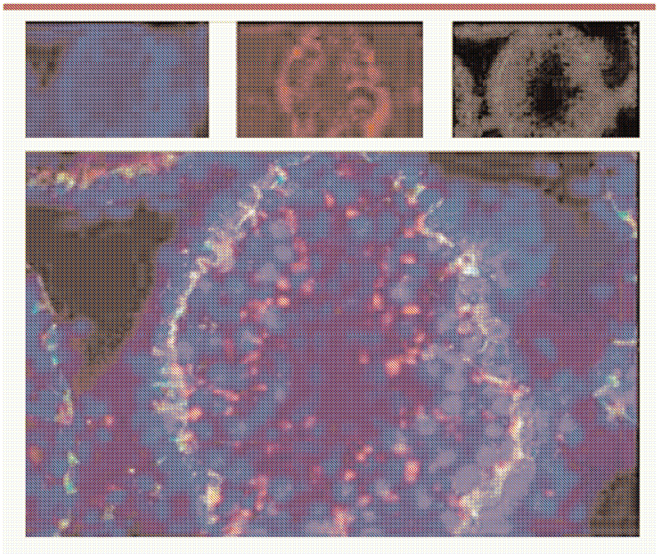


Figure 1. ***Localisation des protéines jonctionnelles sur coupes histologiques de testicule d'un rat de 28 jours.*** L'étude en immunofluorescence d'une section transversale de testicule d'un rat de 28 jours révèle la présence d'occludine, protéine des jonctions serrées (fluorescence verte) et de connexine 43, protéine des jonctions communicantes (fluorescence rouge). Les noyaux des cellules sont colorés par du Hoescht 33342 (en bleu) (N. Prisant, P. Durand, D. Segretain, G. Pointis, communication personnelle).

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 fertilité masculine [3]. C'est, en effet, durant les premiers mois de la vie que les ébauches gonadiques se forment et que la différenciation testiculaire s'effectue, laquelle s'achèvera à la puberté avec le début de la spermatogenèse. C'est pourquoi, des systèmes de culture organotypique de fragments de testicules fœtaux humains ou de rongeurs ont été récemment développés [4]. 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 3 à 5 jours, les effets de substances sur le développement précoce du testicule et sur les gonocytes [5, 6], voire celui des rayons gamma sur ces cellules [7]. Outre que la disponibilité du tissu humain peut limiter une utilisation à grande échelle, ces systèmes, cependant, ne renseignent pas sur les effets éventuels des molécules auxquelles l'individu serait exposé plus tardivement [8], et qui pourraient altérer les différents types de cellules germinales qui se mettent en place au cours des phases de développement néonatal (spermatogonies), prépubertaire (spermatocytes), et pubertaire (spermatides et spermatozoïdes), ou les relations entre cellules testiculaires différenciées.

Les enjeux de REACH

Entrée en vigueur le 1er juin 2007, la réglementation européenne REACH[1] (enregistrement, évaluation, autorisation et restrictions des substances chimiques) a pour objectif l'amélioration des connaissances des propriétés chimiques, toxiques et écotoxiques des substances utilisées dans la vie courante. Environ 30 000 substances chimiques, produites en quantité supérieure à une tonne par an, sont concernées par cette procédure qui sera gérée par l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA). Les substances particulièrement préoccupantes, telles que les CMR (cancérigènes, mutagènes, reprotoxiques), PBT (persistantes, bioaccumulables et toxiques), vPvB (très persistantes et très bioaccumulables) ou les perturbateurs endocriniens, devront obtenir l'autorisation de la Commission européenne, qui s'appuiera sur les recommandations de l'ECHA. Leur utilisation pourra être soumise à restriction, voire être interdite. Selon la Commission européenne, REACH devrait coûter à l'industrie chimique et ses utilisateurs entre 2,8 et 5,2 milliards d'euros sur 11 ans. Les avantages anticipés pour l'environnement et la santé humaine seraient de l'ordre de 50 milliards d'euros sur une période de 30 ans. Pour les molécules concernées par REACH, il sera nécessaire d'effectuer une batterie de tests physico-chimiques, d'écotoxicité et de toxicité. L'expérimentation animale nécessaire à ces tests pourrait entraîner l'utilisation de plusieurs millions d'animaux. Si REACH et la directive 86/609/CEE[2] encouragent l'utilisation de méthodes alternatives comme les modèles cellulaires, la Commission européenne, pour autant, ne définit pas précisément quels tests alternatifs doivent être utilisés. L'évaluation repose donc sur des essais spécifiés par l'OCDE, où l'expérimentation animale est la règle puisque peu de méthodes alternatives ont été validées par cette organisation.

La spermatogenèse

La spermatogenèse se déroule en trois phases : la prolifération des spermatogonies (cellules germinales souches diploïdes) ; la méiose, au cours de laquelle un spermatocyte donne quatre spermatides haploïdes, et la différenciation des spermatides en spermatozoïdes, ou spermiogenèse. Ces étapes se déroulent au sein de l'épithélium séminifère, où les cellules de Sertoli

[1] *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals.* http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach

[2] 24 novembre 1986. Voir http://europa.eu/legislation_summaries/environment/nature_and_biodiversity/l28104_fr.htm

DT_Durand.indd 306 02/03/2010 13:50:04

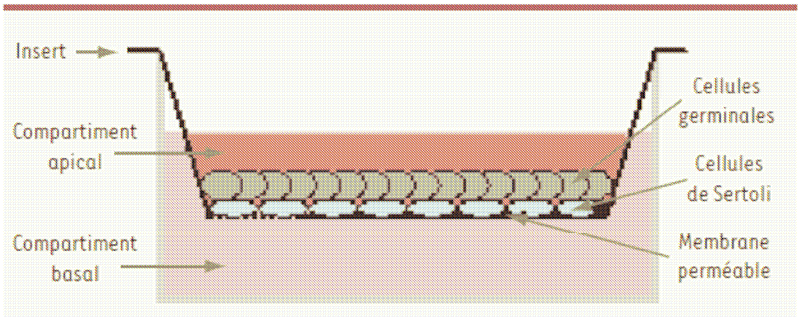


Figure 2. ***Système de coculture des cellules germinales avec des cellules de Sertoli en chambre bicamérale.*** Ce système de coculture est modifiable à façon. Ainsi, il est possible d'ajouter une matrice extracellulaire (soit synthétisée naturellement soit artificielle de type matrigel) entre la membrane et les cellules et de cultiver d'autres cellules somatiques testiculaires (cellules de Leydig par exemple) au fond du puits de culture.

assurent un rôle de support architectural, de protection et de nutrition des cellules germinales, de régulation de la spermatogenèse, ainsi que la phagocytose des cellules germinales surnuméraires ou anormales et des corps résiduels des spermatides. La formation de jonctions serrées entre cellules de Sertoli permet la mise en place d'une barrière hémato-testiculaire *(Figure 1)*. Celle-ci s'établit au début de la puberté lors de l'entrée en méiose des premières cellules germinales et va jouer un rôle de protection contre une réaction auto-immune, et contre des polluants véhiculés par le sang ; elle régit également la composition du fluide testiculaire. Les cellules de Sertoli forment ainsi un microenvironnement indispensable au déroulement de la spermatogenèse.

La spermatogenèse est régulée par des hormones hypothalamo-hypophysaires (la *gonadotropin-releasing hormone* Gn-RH, la *luteinizing hormone* LH et la *follicle-stimulating hormone* FSH), par des hormones, facteurs de croissance et cytokines synthétisés et sécrétés par les cellules somatiques testiculaires (cellules de Leydig, péritubulaires, de Sertoli) et les cellules germinales elles-mêmes, et adsorbés sur la matrice extracellulaire. Les jonctions intercellulaires adhérentes, communicantes (*gap-junction*) et serrées entre cellules de Sertoli et cellules germinales *(Figure 1)*, jouent également un rôle important dans la spermatogenèse. Cette régulation intratesticulaire reste imparfaitement connue. Une des raisons est que certains effecteurs peuvent compenser, au moins en partie, l'absence d'autres régulateurs. De plus, la plupart des facteurs produits dans les testicules sont très exprimés ailleurs dans l'organisme où ils exercent des rôles différents. C'est pourquoi, les modèles animaux modifiés génétiquement, par invalidation ou surexpression de gènes candidats, n'ont pas toujours été à la hauteur des espérances. Même si certains de ces modèles ont permis de comprendre le rôle de plusieurs facteurs sur les premières étapes de la spermatogenèse, l'action de ces facteurs sur les étapes tardives de la spermatogenèse ne peut être étudiée puisque l'invalidation du gène qui les code entraîne un blocage précoce de celle-ci [9]. Pour pallier certaines de ces difficultés, nous développons, depuis 12 ans, des systèmes de culture permettant d'étudier *ex vivo* différentes étapes de la spermatogenèse.

Études physiologiques de la spermatogenèse dans des modèles *ex vivo*

Deux systèmes de coculture de cellules germinales et de cellules de Sertoli de rat ont été établis. Ces cultures, réalisées en chambres de culture bicamérales (à deux compartiments) *(Figure 2)*, permettent la formation et/ou le maintien de la barrière hématotesticulaire *(Figure 3)*. Dans le premier système, différents types de cellules germinales purifiées sont cultivés sur une couche de cellules de Sertoli [10], alors que dans le second système, des morceaux de tubes séminifères sont mis en culture [11, 12]. Ces systèmes permettent d'étudier plusieurs paramètres, au cours d'une période de plus de quatre semaines de culture : (1) la physiologie de la barrière hématotesticulaire ; (2) la survie et la mort des cellules somatiques et germinales ; (3) la prolifération des cellules de Sertoli et des spermatogonies ; (4) les divisions méiotiques *(Figure 4)* ; (5) les caractéristiques cytogénétiques des cellules germinales ; (6) les premiers stades de la spermiogenèse ; (7) le rôle de la matrice extracellulaire ; (8) l'expression de gènes spécifiques dans les cellules germinales ou somatiques (anlyse du transcriptome) ; (9) le profil d'expression et de sécrétion des protéines et peptides exprimés par les différentes cellules (analyse du protéome).

Un aspect important des résultats obtenus avec les modèles *ex vivo* est leur pertinence par rapport au processus physiologique (*in vivo*). Les systèmes développés au laboratoire ont été validés sur de nombreux points de la physiologie. Nous avons ainsi montré que l'ensemble du processus méiotique d'un mammifère peut se dérouler *ex vivo* [13] et que les caractéristiques de la méiose qui se déroule *ex vivo* sont très proches de ce qui se produit dans les testicules de rat à la puberté [14]. Par ailleurs, nous avons montré que les pourcentages de spermatocytes aux différents stades de la prophase I - leptotène, zygotène, pachytène et diplotène[3] - sont les mêmes chez des rats de 42 jours et dans des tubes séminifères prélevés chez des rats âgés de 23 jours et maintenus en culture 16 jours, ce qui indique un développement similaire *in vivo* et *ex vivo* [Geoffroy-Siraudin C, Perrard MH, *soumis pour publication*].

[3] La prophase I occupe 99 % de la durée de la méiose. On y distingue 5 stades : leptotène – zygotène – pachytène – diplotène –diacinèse.

T_Durandmed_887
02/03/2010 13:50:06

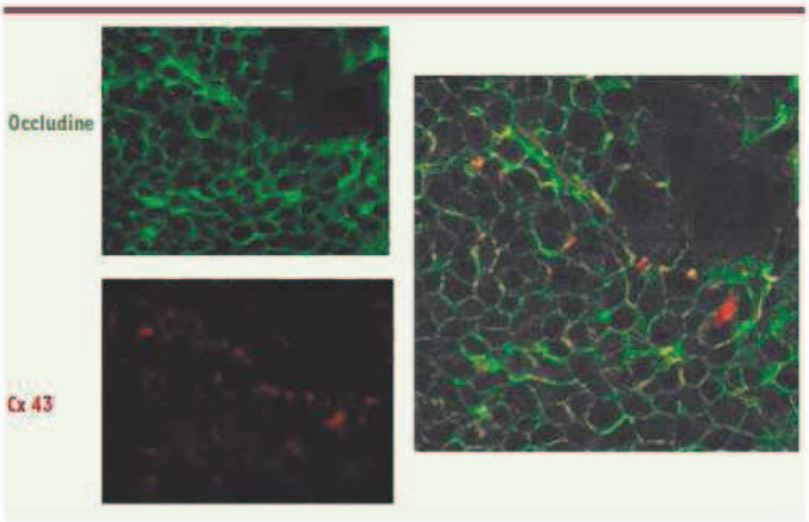


Figure 3. ***Caractérisation de tubules séminifères de rats cultivés in vitro.*** L'étude en immunofluorescence d'une culture de 12 jours de tubes séminifères de rats âgés de 20 jours révèle la présence d'occludine (fluorescence verte) et de connexine 43 (fluorescence rouge) (N. Prisant, P. Durand, D. Segretain, G. Pointis, communication personnelle).

Ces systèmes ont permis d'étudier certains mécanismes de régulation de la spermatogenèse. Après avoir observé que les deux divisions méiotiques sont bloquées par les inhibiteurs pharmacologiques du MPF (*M-phase promoting factor*) [15], il a été démontré que la progression méiotique des spermatocytes nécessite l'action des MAP kinases sertoliennes et des contacts étroits entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli [16]. *In vivo* et *ex vivo*, la connexine 43 (Cx43), protéine transmembranaire constituant certaines jonctions de type *gap*, est détectée entre les cellules de Sertoli et entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales *(Figures 1 et 3)*. Or, une étude récente montre l'absence de cellules germinales en aval des spermatocytes primaires lorsque la Cx43 est remplacée par la Cx26 chez des souris transgéniques [17]. L'approche *ex vivo* a permis de montrer que la Cx43 localisée entre les cellules de Sertoli et les spermatogonies est impliquée dans la survie de ces cellules germinales et que la Cx43 des jonctions entre cellules de Sertoli participe au contrôle de la prolifération de ces dernières [18]. De même, les modèles de *knock-out* (*KO*) conditionnel pour le gène *Cx43*, montrent que la Cx43 est essentielle au contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules de Sertoli [19].

Dans ces cocultures, Vigier *et al.* ont montré que la FSH et la testostérone, à des concentrations physiologiques, ont des effets positifs et redondants sur les deux divisions de la méiose et sur l'expression de gènes exprimés par les cellules germinales haploïdes [20]. Ces résultats ont été depuis confirmés par d'autres équipes qui utilisent des modèles de souris *KO* [21, 22].

Dans les tubes séminifères, le NGF (*nerve growth factor)* et ses deux récepteurs sont exprimés de manière similaire *in vivo* et *ex vivo* et le NGF et le TGF-β1 (*transforming growth factor)* régulent négativement la deuxième division de méiose *ex vivo* [23, 24]. De plus, le NGF et le TGF-β1 ont un effet totalement redondant sur cette étape [25]. Cette redondance offre une explication aux résultats d'une étude, faite chez des souris SCID *(severe combined immunodeficient)*, qui rapportait l'absence d'effet de l'invalidation du *Tgf-β1* sur la méiose [26]. En effet, ce sont les spermatocytes pachytènes et les spermatides rondes précoces qui synthétisent le TGF-β1 en plus grande abondance [27], celles-là mêmes qui synthétisent le NGF [24]. Par conséquent, il est raisonnable de penser que l'absence d'effet observé, dans cette étude, est due à l'effet redondant du NGF sur cette étape.

Concernant l'étape mitotique *ex vivo*, Fouchécourt *et al.* ont rapporté un effet inhibiteur du GDNF (*Glial cell line-derived neurotrophic factor)* sur l'entrée en phase S d'une grande population de spermatogonies différenciées de type A et un effet positif sur l'entrée en phase S d'une petite population de spermatogonies indifférenciées [28]. Ces études corroborent les résultats des études *in vivo* [29].

L'ensemble de ces données démontre que ces systèmes de coculture permettent d'étudier les mécanismes physiologiques impliqués dans la spermatogenèse.

Évaluation du potentiel toxique des produits chimiques *ex vivo*

Ces systèmes de coculture sont aussi pertinents pour évaluer les effets toxiques de substances chimiques sur la spermatogenèse, tout en réduisant (de 10 à 20 fois) le nombre d'animaux utilisés. Soulignons que ces systèmes permettent 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 cette barrière. En revanche, dans une culture classique, un composé peut être toxique pour les cellules germinales différenciées, car il est directement en contact avec celles-ci, tandis qu'*in vivo*, il peut ne pas avoir accès au compartiment des tubes séminifères où résident ces cellules germinales.

Dans ces modèles de culture dans des chambres à plusieurs compartiments, il est possible d'étudier un grand nombre de paramètres permettant de déterminer

_Durand.indd 308 02/03/2010 13:50:08

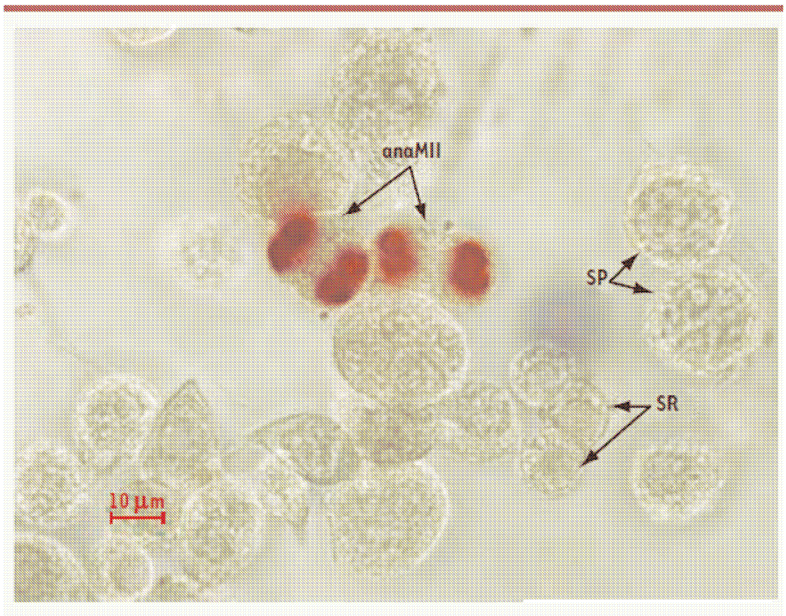


Figure 4. ***Aspect d'une coculture de spermatocytes au stade pachytène élutriés avec des cellules de Sertoli.*** Les spermatocytes pachytènes sont cocultivés avec les cellules de Sertoli. La mise au point du microscope est effectuée sur les cellules germinales qui adhèrent au tapis sertolien. Les cellules en division sont marquées par un anticorps anti-phospho-histone H3, les noyaux cellulaires sont contre-colorés à l'hématoxyline. On visualise deux anaphases de deuxième division de méiose (anaMII), des spermatocytes pachytènes (SP), des spermatides rondes (SR). L'analyse est faite au jour 3 de la culture. La barre représente 10 µm.

les mécanismes de la toxicité gonadique de faibles concentrations de composés organiques ou minéraux. Il est également possible de corréler les perturbations somatiques et germinales observées au cours de la culture aux modifications du transcriptome/protéome de ces cellules. Il convient de souligner que la connaissance du mode d'action de ces molécules aidera à vérifier si les observations faites chez les animaux sont transposables à l'homme, ce qui est un problème majeur dans ce type d'étude.

L'analyse des altérations observées dans une même population cellulaire exposée ou non à la substance à analyser permet de s'affranchir d'une grande partie de la variabilité inter-animaux rencontrée *in vivo* et d'optimiser ainsi la puissance des tests statistiques[4]. Un intérêt supplémentaire de ces systèmes de culture est qu'ils permettent de tester l'effet de combinaisons de molécules à de faibles concentrations pendant une période de plusieurs semaines.

Récemment, ces systèmes ont été utilisés pour étudier les effets de métaux lourds et des radiations ionisantes. Geoffroy-Siraudin *et al.* ont montré qu'une concentration de 1 µg/l de chrome altère gravement les complexes synaptonémaux des cellules méiotiques [*soumis pour publication*]. Perrin *et al.* ont comparé des cellules germinales exposées ou non à une irradiation par rayons gamma. Pour les spermatocytes non irradiés, le test des comètes (ou *single cell gel electrophoresis*), une technique de quantification et d'analyse des dommages de l'ADN au sein d'une cellule, a révélé la présence de cassures dans l'ADN, dont le nombre a diminué au cours de la coculture, témoignant de l'implication de mécanismes de réparation de l'ADN associés à la recombinaison méiotique. Dans les cellules irradiées, l'évolution des cassures d'ADN a été fortement modifiée [30].

[4] http://statpages.org/#Comparisons

Conclusion

Nous assistons depuis quelques 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). Il devient indispensable de mieux connaître leur impact sur la santé humaine et sur l'environnement. Les systèmes de coculture développés au laboratoire, couplés à des méthodes analytiques performantes, sont un outil pertinent non seulement pour étudier la physiologie de la spermatogenèse mais aussi pour rechercher l'effet toxique sur la reproduction de substances polluantes et étudier les mécanismes moléculaires liés à leur toxicité. Enfin, ces systèmes répondent à la forte demande sociétale de réduire le nombre d'animaux utilisés pour les études biomédicales et toxicologiques. ◊

SUMMARY

European regulation REACH and the assessment of testicular toxicity

Several studies suggest that exposure to environmental pollutants is partly responsible for testicular pathologies that have considerably increased over the last decades (cryptorchidism, hypospadias, cancer, decrease in the number of ejaculated spermatozoa). However, the cellular and molecular mechanisms involved in this reprotoxicity remain mostly unknown. One of the challenges of the european regulation REACH is to improve the knowledge on the chemical, toxic and ecotoxic proper-

02/03/2010 13:50:0

ties of substances used in everyday life. As for the testicular toxicity, the few *in vivo* models used are not always the most appropriate for mechanistic studies. Our laboratory has developed and validated on a physiological point of view, coculture systems of germ cells in bicameral chambers, which reproduce a blood-testis barrier, allowing the determination of the mechanisms responsible for the toxicity of organic or mineral compounds on spermatogenesis, while reducing greatly the number of animals required. ◊

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient par ordre alphabétique : Anne Damestoy, Sophie Fouchécourt, Muriel Godet, Dominique Hue, Hervé Lejeune, Cécile Marret, Guillaume Montillet, Jean-Claude Nicolle, Ingrid Plotton, Christophe Staub, Michèle Vigier, Michèle Weiss pour leur participation aux études menées dans « l'équipe Durand ».

M.H. Perrard et C. Grenet ont contribué de manière équivalente à la rédaction de cet article.

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Olesen IA, Sonne SB, Hoei-Hansen CE, *et al.* Environment, testicular dysgenesis and carcinoma *in situ* testis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007 ; 21 : 462-78.
2. Pineau C, Dupaix A, Jégou B. The coculture of Sertoli cells and germ cells: applications in toxicology. *Toxicol In Vitro* 1999 ; 13 : 513-20.
3. Delbès G, Levacher C, Duquenne C, Habert R. Le testicule fœtal est-il en danger ? *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 1083-8.
4. Lambrot R, Livera G, Coffigny H, *et al.* A new method for toxicity assays on human and mouse fetal testis. *Biochimie* 2006 ; 88 : 1831-5.
5. Lambrot R, Muczynski V, Lécureuil C, *et al.* Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis *in vitro* without change in testosterone production. *Environ Health Perspect* 2009 ; 117 : 32-7.
6. Chauvigné F, Menuet A, Lesné L, *et al.* 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* 2009 ; 117 : 515-21.
7. Lambrot R, Coffigny H, Pairault C, *et al.* High radiosensitivity of germ cells in human male fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 ; 92 : 2632-9.
8. Cravedi JP, Zalko D, Savouret JF, *et al.* Le concept de perturbation endocrinienne et la santé humaine. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 198-204.
9. Escalier D. Knockout mice in the service of reproduction. *Gynecol Obstet Fertil* 2008 ; 36 : 1224-9.
10. Weiss M, Vigier M, Hue D, *et al.* Pre- and postmeiotic expression of male germ cell-specific genes throughout 2-week cocultures of rat germinal and Sertoli cells. *Biol Reprod* 1997 ; 57 : 68-76.
11. Hue D, Staub C, Perrard-Sapori MH, *et al.* Meiotic differentiation of germinal cells in three-week cultures of whole cell population from rat seminiferous tubules. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 379-87.
12. Marret C, Durand P. 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* 2000 ; 40 : 305-19.
13. Staub C, Hue D, Nicolle JC, *et al.* The whole meiotic process can occur *in vitro* in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp Cell Res* 2000 ; 260 : 85-95.
14. Perrard MH, Hue D, Staub C, *et al.* Development of the meiotic step in testes of pubertal rats: comparison between the *in vivo* situation and under *in vitro* conditions. *Mol Reprod Dev* 2003 ; 65 : 86-95.
15. Godet M, Damestoy A, Mouradian S, *et al.* Key role for cyclindependent kinases in the first and second meiotic divisions of rat spermatocytes. *Biol Reprod* 2004 ; 70 : 1147-52.
16. Godet M, Sabido O, Gilleron J, Durand P. Meiotic progression of rat spermatocytes requires mitogen-activated protein kinases of Sertoli cells and close contacts between the germ cells and the Sertoli cells. *Dev Biol* 2008 ; 315 : 173-88.
17. Winterhager E, Pielensticker N, Freyer J, *et al.* Replacement of connexin43 by connexin26 in transgenic mice leads to dysfunctional reproductive organs and slowed ventricular conduction in the heart. *BMC Dev Biol* 2007 ; 7 : 26.
18. Gilleron J, Carette D, Durand P, *et al.* Connexin 43 a potential regulator of cell proliferation and apoptosis within the seminiferous epithelium. *Int J Biochem Cell Biol* 2009 ; 41 : 1381-90.
19. Sridharan S, Simon L, Meling DD, *et al.* Proliferation of adult sertoli cells following conditional knockout of the Gap junctional protein GJA1 (connexin 43) in mice. *Biol Reprod* 2007 , 76 . 804-12.
20. Vigier M, Weiss M, Perrard MH, *et al.* The effects of FSH and of testosterone on the completion of meiosis and the very early steps of spermiogenesis of the rat: an *in vitro* study. *J Mol Endocrinol* 2004 ; 33 : 729-42.
21. Abel MH, Baker PJ, Charlton HM, *et al.* Spermatogenesis and sertoli cell activity in mice lacking sertoli cell receptors for follicle stimulating hormone and androgen. *Endocrinology* 2008 ; 149 : 3279-85.
22. De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, *et al.* A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 1327-32.
23. Damestoy A, Perrard MH, Vigier M, *et al.* Transforming growth factor beta-1 decreases the yield of the second meiotic division of rat pachytene spermatocytes *in vitro*. *Reprod Biol Endocrinol* 2005 ; 3 : 22.
24. Perrard MH, Vigier M, Damestoy A, *et al.* Beta-nervegrowth factor participates in an auto/paracrine pathway of regulation of the meiotic differentiation of rat spermatocytes. *J Cell Physiol* 2007 ; 210 : 51-62.
25. Perrard MH, Durand P. Redundancy of the effect of TGFbeta1 and beta-NGF on the second meiotic division of rat spermatocytes. *Microsc Res Tech* 2009 ; 72 : 596-602.
26. Ingman WV, Robertson SA. Transforming growth factor-beta1 null mutation causes infertility in male mice associated with testosterone deficiency and sexual dysfunction. *Endocrinology* 2007 ; 148 : 4032-43.
27. Teerds KJ, Dorrington JH. Localization of transforming growth factor beta 1 and beta 2 during testicular development in the rat. *Biol Reprod* 1993 ; 48 : 40-5.
28. Fouchécourt S, Godet M, Sabido O, Durand P. Glial cell-line-derived neurotropic factor and its receptors are expressed by germinal and somatic cells of the rat testis. *J Endocrinol* 2006 ; 190 : 59-71.
29. Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, *et al.* Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 2000 ; 287 : 1489-93.
30. Perrin J, Lussato D, De Meo M, *et al.* Evolution of DNA strand-breaks in cultured spermatocytes: the Comet Assay reveals differences in normal and gamma-irradiated germ cells. *Toxicol In Vitro* 2007 ; 21 : 81-9.

TIRÉS À PART

P. Durand

II- Impact du Chrome Hexavalent (Cr VI) sur la spermatogenèse du rat

1- Le chrome hexavalent (Cr VI) : caractéristiques

Le chrome est un métal lourd, présent dans notre environnement sous 2 formes principales : le chrome III qui est la forme réduite, et le chrome hexavalent Cr(VI). Il est utilisé dans de nombreuses industries : métallurgie, soudure, industrie chimique, industrie textile, tannerie, peinture, traitement du bois, traitements de surface dans l'aéronautique, photographie, systèmes de refroidissement. Il a une toxicité aigue et chronique connue par inhalation, contact cutané ou ingestion (Barceloux et coll. 1999 ; Von Burg et Liu. 1993). Il a été identifié comme responsable de cancers pulmonaires, de dermatites, d'une hépatotoxicité, d'une néphrotoxicité et d'une génotoxicité. Dans la classification CMR, le Cr VI et reconnu comme toxique carcinologique de 2ème catégorie et reprotoxique de 3ème catégorie.

Quelques études ont été réalisées chez l'homme sur le thème "exposition professionnelle au chrome et fertilité". Parmi elles, l'étude de Li et coll. (2001) compare à des témoins la fertilité de 21 hommes chinois exposés au chrome dans le cadre de leur activité professionnelle dans une usine de galvanoplastie. Les résultats des spermogrammes réalisés montrent une diminution significative de la mobilité et de la numération des spermatozoïdes chez les hommes exposés (47 Millions/ml versus 88 Millions/ml chez les témoins, et 69.7% de mobilité versus 81.9% chez les témoins). Les taux de FSH sérique sont significativement plus élevés chez les sujets exposés que chez les témoins (7.34 UI/ml versus 2.41 UI/ml). Le zinc séminal, reconnu comme antioxydant, est significativement abaissé chez les sujets exposés (1.48 µmol/ml versus 5.72 µmol/ml). Une seconde étude, réalisée par Danadevi et coll en 2003, s'est intéressée à 57 employés d'une usine de soudure en Inde dont les résultats ont été comparés à ceux de 57 contrôles. Là encore, les paramètres du spermogramme

contrôlés à 2 reprises à 2 semaines d'intervalles sont altérés : ils montrent une diminution significative de la numération, de la mobilité, de la vitalité et du pourcentage de formes typiques. Une corrélation positive est retrouvée entre les concentrations sanguines de chrome et l'importance des anomalies observées.

Les études réalisées chez l'animal sont plus nombreuses. Différentes espèces animales ont été étudiées (rats, souris, singes) après exposition au chrome soit par ingestion (eau de boisson, nourriture), soit par injection (intra-péritonéale, sous-cutanée). L'exposition de rats au Cr (VI) par injection intra-péritonéale pendant 8 semaines (Ernst et Bonde, 1992) a provoqué une diminution de la mobilité des spermatozoïdes ainsi que des troubles hormonaux : augmentation de la FSH et diminution de la testostérone. Elbetieha et coll. (1997) ont centré leurs investigations sur des paramètres cliniques après exposition de souris par ingestion de Cr (VI) dans leur eau de boisson pendant 12 semaines. Le poids des animaux ainsi que celui de leurs organes génitaux mâles et femelles étaient significativement diminués. Les souris femelles ont présenté moins de grossesse, plus d'avortements spontanés et plus de souriceaux porteurs de malformations à la naissance. Les études suivantes (Li et coll. 2001, Pereira et coll. 2002 et 2004, Aruldhas et coll. 2005) ont plus particulièrement analysé l'histologie testiculaire des animaux après l'exposition au chrome. Dans tous les cas, une nette désorganisation des tubes séminifères a été notée, avec vacuolisation des cellules de Sertoli tandis que les cellules germinales étaient peu nombreuses et altérées. Néanmoins les mécanismes d'action du chrome restent en grande partie inconnus. Kawanishi et coll. (1986) ont montré que le Cr(VI) produisait des espèces radicalaires de l'oxygène lors de sa transformation en Cr(V). Les souris males exposées au Cr(V) présentent une altération de la perméabilité de la barrière hémo-testiculaire (Pereira et coll. 2004).

2- Effet du Chrome hexavalent sur la spermatogenèse du rat obtenue ex-vivo

Dans notre étude, nous avons introduit le chrome dans le compartiment basal du système de culture à chaque renouvellement du milieu (toutes les 48h). Les concentrations de Cr(VI) utilisées ont été déterminées d'après les concentrations retrouvées dans les liquides biologiques d'animaux exposés au chrome (Aruldhas et coll. 2005). Comme in vivo, le toxique doit franchir la barrière hémo-testiculaire préservée dans notre modèle avant d'atteindre les cellules germinales sur lesquelles il peut avoir un effet direct ou indirect via les cellules de Sertoli. C'est pourquoi nous nous sommes assurés dans un premier temps que le Cr(VI) ajouté dans le milieu basal pouvait bien être détecté au niveau des cellules obtenues en culture. Les dosages réalisés confirment qu'il n'y a pas de Cr(VI) détectable dans les cultures témoins et que, dans les cultures réalisées en présence de Cr(VI), la concentration cellulaire de chrome augmente avec les concentrations du toxique ajouté dans le milieu basal. Nous avons réalisé 3 séries de culture avec pour chacune une culture témoin et 3 cultures à doses croissantes de Cr(VI) : 1, 10 et 100µg/L.

Les analyses en cytométrie de flux retrouvent, comme lors des travaux précédents (Hue et coll. 1998, Staub et coll. 2000) une décroissance du nombre total de cellules par puits que ce soit dans les cultures témoins ou celles en présence de Cr(VI) sans aucun impact de la concentration de toxique choisie. Cependant, les différents types cellulaires ne semblent pas réagir tous de la même manière à la présence du toxique. Le nombre de cellules de Sertoli et de spermatocytes précoces n'est pas modifié par la présence de Cr(VI) alors que les cellules plus tardives se raréfient de manière dose-dépendante: jusqu'à 65 +/- 3% des valeurs contrôles pour les spermatides rondes.

La chronologie méiotique n'est pas altérée en présence du chrome (VI), quelque soit sa concentration. Dans toutes les cultures, le pourcentage de spermatocytes au stade leptotène est maximal à J5 puis décroît jusqu'à J16. Les pourcentages de noyaux aux stades zygotène et

pachytène reste stables au fil de la culture tandis que les noyaux au stade diplotène augmentent significativement entre le début et la fin de la culture.

L'analyse qualitative des spermatocytes au stade pachytène montre clairement l'impact du chrome hexavalent sur la méiose du rat. Le pourcentage total de noyaux anormaux augmente régulièrement et significativement au cours de la culture de manière dose-dépendante (R^2=0.84, $p< 0.05$; R^2=0.90, $p< 0.05$; et R^2=0.93, $p< 0.01$ pour les concentrations de 1, 10 et 100 µg/L de Cr(VI) respectivement). Les asynapsis et la fragmentation des CS sont les 2 anomalies les plus fréquentes.

Notre étude démontre que l'analyse quantitative de la richesse cellulaire ne peut pas être suffisante pour évaluer l'effet d'un toxique sur les cellules germinales. Une analyse qualitative fine est indispensable pour approcher les mécanismes par lesquels les toxiques altèrent la spermatogenèse. Les anticorps spécifiques dont nous disposons aujourd'hui pour analyser la prophase de première division méiotique permettent un diagnostic précis des altérations provoquées par le toxique étudié. Ce modèle de culture de tubes séminifères peut non seulement être appliqué à de nombreux autres toxiques, seuls ou en association, mais aussi permettre la réalisation d'autres tests de mutagenèse et de toxicité pour une meilleure compréhension de l'effet de notre environnement sur la fertilité.

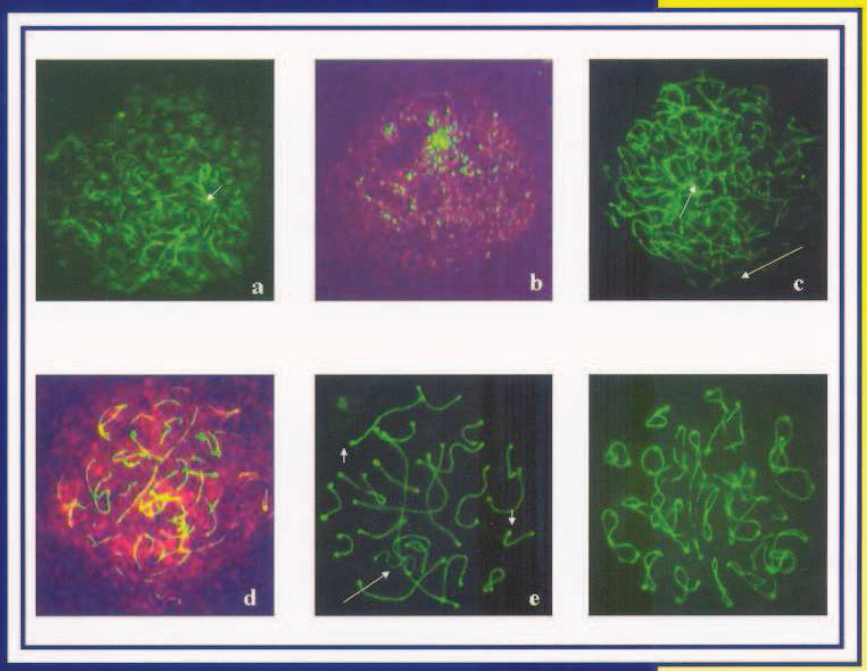
Validation of a rat seminiferous tubule culture model as a suitable system for studying toxicant impact on meiosis of hexavalent chromium

Geoffroy-Siraudin C, Perrard MH, Chaspoul F, Lanteaume A,

Gallice Ph, Durand Ph, Guichaoua MR.

Toxicological Sciences, 2010, 116(1): 286-296

ISSN 1096-6080 (PRINT)
ISSN 1096-0929 (ONLINE)
Volume 116, Number 1, July 2010
www.toxsci.oxfordjournals.org



TOXICOLOGICAL SCIENCES

The Official Journal of the Society of Toxicology

OXFORD OPEN
OXFORD JOURNALS
OXFORD UNIVERSITY PRESS

TOXICOLOGICAL SCIENCES 116(1), 286–296 (2010)
doi:10.1093/toxsci/kfq099
Advance Access publication April 1, 2010

Validation of a Rat Seminiferous Tubule Culture Model as a Suitable System for Studying Toxicant Impact on Meiosis Effect of Hexavalent Chromium

Cendrine Geoffroy-Siraudin,*,† Marie-Hélène Perrard,‡ Florence Chaspoul,* André Lanteaume,* Philippe Gallice,* Philippe Durand,‡ and Marie-Roberte Guichaoua*,†,[1]

*Laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale (EA1784), Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France. FR CNRS 3098-Ecosystemes Continentaux et Risques Environnementaux ECCOREV, Europôle de l'Arbois, 13150 Aix-en Provence, France; †Laboratoire de Biologie de la Reproduction, AP-HM, Hôpital de la Conception, 147 Boulevard Baille, 13385 Marseille Cedex 5, France; and ‡Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, UMR 5242 CNRS INRA Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon 1, 46 allée d'Italie, F-69364 Lyon Cedex 07, France

[1]To whom correspondence should be addressed. Fax: 04-91-38-38-97. E-mail: mguichaoua@ap-hm.fr.

Received January 6, 2010; accepted March 23, 2010

There is evidence that exposure to environmental factors is at least partly responsible for changes in semen quality observed over the past decades. The detection of reproductive toxicants under Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals (REACH) will impact animal use for regulatory safety testing. We first validated a model of culture of rat seminiferous tubules for toxicological studies on spermatogenesis. Then, using this model of culture, we assessed the deleterious effects of 1, 10, and 100 µg/l hexavalent chromium [Cr(VI)] on meiotic cells. The prophase I of meiosis was studied *in vivo* and *ex vivo*. Bromo-2′-deoxyuridine (BrdU) was used to describe the kinetics of germ cell differentiation. SCP3 labeling allowed to establish the distribution of the stages of the meiotic prophase I and to perform a qualitative study of the pachytene stage in the absence or presence of Cr(VI). The development of the meiotic step of pubertal rats was similar *in vivo* and *ex vivo*. The number of total cells appeared not affected by the presence of Cr(VI) irrespective of its concentration. However, the numbers of late spermatocytes and of round spermatids were decreased by Cr(VI) even at the lower concentration. The percentage of synaptonemal complex abnormalities increased slightly with the time of culture and dramatically with Cr(VI) concentrations. This model of culture appears suitable for toxicological studies. This study shows that Cr(VI) is toxic for meiotic cells even at low concentrations, and its toxicity increases in a dose-dependent manner.

Key Words: meiosis; spermatogenesis; rat; culture; synaptonemal complex; hexavalent chromium.

Since the meta-analysis of Carlsen *et al.* (1992), numerous studies have dealt with the sharp decline in sperm quality in both fertile and infertile men (Irvine *et al.*, 1996; Lackner *et al.*, 2005). There is now evidence that exposure to environmental factors is at least partly responsible for such remarkable changes in semen quality. Recently, Jensen *et al.* (2008) hypothesized that the decreased conception rate among young cohorts of Danish women may partly be explained by the poor semen quality of their partners. Many chemicals present in our environment may be involved in reproduction disruption, but their cellular and molecular mechanisms are still obscure. Indeed, most studies did not precisely evaluate the germ cell damages and the stages of spermatogenesis that were altered. Yet, to appreciate the risks of a toxicant for men and their progeny, it is essential to know when and how the substance can act on germ cell differentiation. Today, Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals (REACH), a European community regulation on chemicals and their safe use (1907/2006), imposes to industrials toxic and reprotoxic studies for products sold with more than 100 T/year. The Joint Research Centre of the European Commission (Pedersen *et al.*, 2003) estimated necessary to test 2893 chemicals for reproductive toxicity and 2135 chemicals for developmental toxicity. By following the guidelines for regulatory safety testing, millions of animals would be required only for the detection of reproductive/developmental toxicants (Hartung and Rovida, 2009). In this context, new experimental models need to be developed to study the sites and the mechanisms of action of potential male reproductive toxicants.

In this study, we aimed to validate the system of culture of seminiferous tubules settled by Durand and coworkers for toxicological studies on spermatogenesis. Indeed, this system that allows studying the mitotic phase of spermatogenesis, the entire meiotic phase, and the first steps of spermiogenesis over a 4-week culture period in the rat (Fouchécourt *et al.*, 2006; Hue *et al.*, 1998; Staub *et al.*, 2000) has been extensively validated from the physiological point of view over the past 10 years (see review in Perrard *et al.*, 2009). In addition, it

© The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of the Society of Toxicology. All rights reserved.
For permissions, please email: journals.permissions@oxfordjournals.org

must be underlined that this model of culture in bicameral chamber allows studying the effects of a toxic substance added to the basal compartment of the chamber and thus mimics what could happen *in vivo* in the testis. Indeed, the intercellular junctions are maintained in this system of culture (Perrard *et al.*, 2009; Staub *et al.*, 2000), and therefore, before reaching the germ cells, the toxic substances must cross the barrier of Sertoli cells (main component of the blood-testis barrier). Conversely, in "conventional" culture chambers, an agent may be toxic to differentiating germ cells because it is placed directly in contact with these cells, whereas *in vivo*, it may not have access to the compartment of the seminiferous tubules where these populations of germ cells are located. Another interest of this culture system is the reduction of the number of animals used and of the testing costs. Indeed, testicular germ cells from one rat allow performing 10–20 different assays. In the present work, we chose to study more specifically the prophase I of meiosis, during which the mechanisms of pairing and recombination could be strategic targets for toxicants (Martin, 2006). These two meiotic phenomena greatly influence the quality of spermatogenesis.

Using this culture model, we assessed the deleterious effects of the hexavalent chromium [Cr(VI)] on meiotic cells and its mechanisms. Cr(VI) compounds find extensive application in diverse industries and induce dose-dependent acute and chronic toxicity (Barceloux, 1999; Von Burg and Liu, 1993). A growing body of studies are available regarding the reproductive effects of chromium in men and animals (Aruldhas *et al.*, 2005; Danadevi *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2004), but a detailed analysis of spermatogenesis is not available. Kawanishi *et al.* (1986) have demonstrated that Cr(VI) produce noxious ROS including superoxide anion, singlet oxygen, and hydroxyl radicals through the formation of chromium (V) [Cr(V)] intermediates. In male mice exposed to Cr(V), the major finding reported was the alteration of permeability of the blood-testis barrier (Pereira *et al.*, 2004).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Wistar rats, 100 days old (adult rat), 42 days old, or 23 days old, having undergone no treatment were used. For meiotic *in vivo* studies, three rats of each age were used. Both testes were quickly removed and frozen in Ham F10/10% glycerol in liquid nitrogen. For cultures (*ex vivo* studies) in order to counterbalance inter-animal variations, testes from six to ten 23-day-old rats were pooled in every experiment and immediately used as described below.

Preparation and Culture of Seminiferous Tubule Segments

This technique has been published previously (Hue *et al.*, 1998; Staub *et al.*, 2000). Incubation was carried out at 32°C in the culture medium, supplemented as above, in a water-saturated atmosphere of 95% air and 5% CO_2.

Three cultures were performed in the absence or presence of Cr(VI). When required, Cr(VI) was added from day 2 of the cultures as follows: An aqueous solution stock (20 mg/l) of potassium dichromate (RP Normapur Prolabo, France) was diluted in the culture medium in order to obtain a final concentration of Cr(VI) of 1 or 10 or 100 µg/l. The Cr(VI) solutions were then added in the basal compartment of the bicameral chambers of culture. These concentrations of chromium were selected on the basis of the mean plasma concentrations found in nonexposed healthy men (0.3–0.5 µg/l) and in workers exposed to hexavalent chromium (73.4 µg/l) (Li *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 1988). Only basal media (with or without Cr(VI)) were renewed every 2 days. Two additional cultures were performed in the presence of bromo-2′-deoxyuridine (BrdU) to study the sequential appearance of the various categories of germ cells during the prophase I of meiosis and to follow the fate of the labeled cells during the cultures. Immediately after seeding the cells, BrdU (1µM) was added in both compartments of the bicameral chamber and left during 20 h, which corresponds roughly to the duration of the pre-meiotic S phase in the rat (Perrard *et al.*, 2003).

At selected days of culture, cells were detached from the permeable membrane of the bicameral chambers by trypsinization. An aliquot of the cell suspension was used to determine the number of cells and to assess cell viability by trypan blue exclusion. Aliquots of cells were frozen at −80°C in culture medium supplemented with 10% glycerol. Remaining cells were fixed with ice-cold 70% ethanol for Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) analysis.

TABLE 1
Operational Parameters of ICP-MS

Parameter	Value
Argon gas flow rates (l/min)	
Plasma	15.0
Auxiliary	0.9
Carrier	1.0
Collision gas (He 97%, H_2 3%) (l/min)	1.2
Sampling depth (mm)	6.8
Nebulizer	Meinhard
Spray chamber	Double pass, quartz
Spray chamber temperature (K)	275
Sample uptake (ml/min)	1.0

Measurement of the Chromium Concentration in the Cultured Cells

Chromium analysis was performed using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) as previously described (Chardin *et al.*, 2002) on days 5, 9, and 16 of the cultures performed in the absence or presence of Cr(VI) as follows. Cell suspensions (200–800 µL) were diluted by adding nitric acid 63% ultrapure (40 µL) and ultrapure water 18 MΩ (2 ml). The solutions obtained were then analyzed in triplicate by ICP-MS using a Thermo Series II ICP-MS apparatus equipped with a collision cell (Thermo-Electron, Les Ulis, France). Operational parameters are given in Table 1. The calibration curve was obtained by dilution of a multi-element solution in 1% nitric acid to yield 0.5, 1.0, 10.0, and 100.0 µg/l of chromium. Metal concentrations were finally determined using Plasmalab software (Thermo-Electron), and results were expressed as cellular chromium concentrations (nanograms per 10^6 cells).

Cytological Methods

Spreading and fixation of germ cells. Cell suspensions were pre-fixed before spreading in 0.1% paraformaldehyde (PAF) (Merck, Germany) in medium culture for 5 min. Stock solution of PAF at 2% was prepared in distilled water. To perform immunocytochemical analysis, meiotic cells were spread by cytocentrifugation at 30 × g according to Metzler-Guillemain and Guichaoua (2000).

Immunocytological localization of axial elements and lateral elements of synaptonemal complexes in spermatocytes. A rabbit polyclonal anti-SCP3 antibody (Abcam, UK) was used to reveal axial elements and lateral elements of synaptonemal complexes in freshly prepared adult rat spermatocytes or in cultured spermatocytes. Immunocytochemistry was performed according to Metzler-Guillemain and Guichaoua (2000).

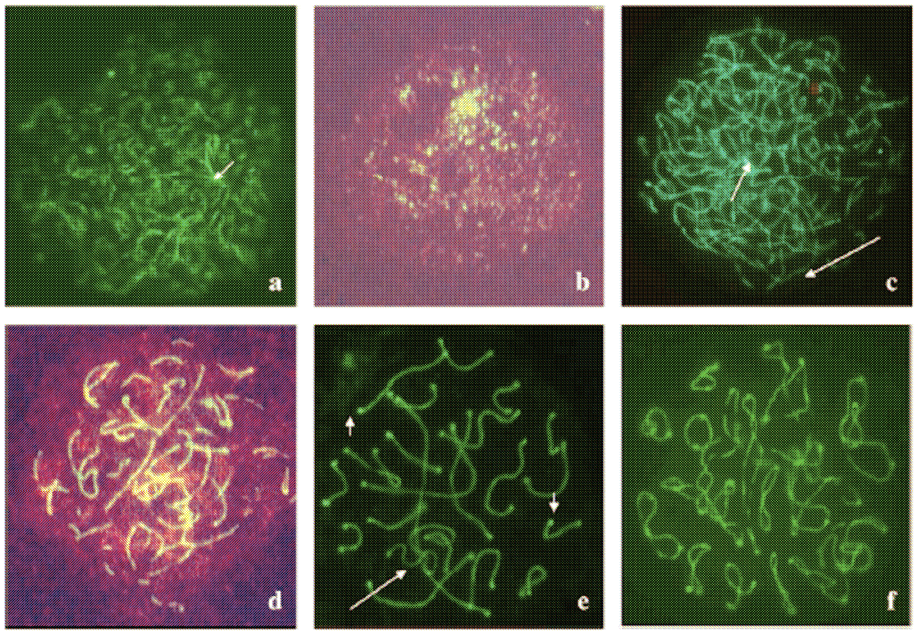


FIG. 1. Different substages of meiosis in the rat. Nuclei of spermatocytes I were stained by an anti-SCP3 antibody (green). A monoclonal anti-BrdU antibody revealed preleptotene spermatocytes that underwent DNA synthesis at the beginning of the culture (red). (a) Leptotene nuclei showing discontinuous axial elements; SC are initiated in two homologues (arrow). (b) Polarized leptotene spermatocyte double stained for SCP3 and BrdU. (c) Zygotene nuclei showing paired (short arrow) and unpaired regions (long arrow). (d) Zygotene nuclei with double staining for SCP3 and BrdU in which most homologous chromosomes are paired. (e) Pachytene nuclei in which all homologous chromosomes are paired and showing SC large ends (long arrow = sex chromosomes, short arrows = two large ends). (f) Diplotene showing separated lateral elements of SC, except at chiasma sites.

Immunocytological localization of axial elements and lateral elements of synaptonemal complexes in BrdU-labeled spermatocytes. Dual-color immunocytochemistry was performed with a rabbit polyclonal anti-SCP3 antibody and a mouse monoclonal anti-BrdU antibody (Dako cytomation, Denmark) to reveal cells that underwent DNA synthesis at the beginning of the culture (spermatogonia and preleptotene spermatocytes). Cells were stained with the anti-SCP3 antibody as described in Metzler-Guillemain and Guichaoua (2000). The cells were then rinsed in PBS 1× and mounted in Vectashield. On the following day, the cells were fixed again in 2% PAF/0.03% SDS, then in 2% PAF for 3 min before denaturing in formamide at 74°C for 3 min, and immersed in alcohol at −20°C. Cells were incubated with the anti-BrdU antibody at 1:25 dilution for 2 h at room temperature. After washing in 0.4% photoflo/PBS and then in 0.01% Triton/PBS and blocking buffer, detection was performed with a tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC)–conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin G (IgG) (Abcam) at 1:100 dilution for 1 h at 37°C. Cells were then rinsed in PBS and mounted in Vectashield.

Microscope Analysis

Spermatocyte nuclei were observed using a Zeiss Axioplan 2 fluorescent photomicroscope (Zeiss, Germany). For *in vivo* differentiated spermatogenic cells, 1000 nuclei were analyzed at every age studied. For cells differentiated in culture, 300 nuclei were analyzed at each day studied.

Immunolabeling of Cultured Cells for Flow Cytometric Analysis

To distinguish germ cells from Sertoli cells, fixed cultured cells were immunolabeled with a monoclonal antibody against vimentin (clone V9; DAKO SA, Trappes, France), followed by a rabbit anti-mouse IgG phycoerythrin (PE)–conjugated antibody as previously described in detail (Godet *et al.*, 2000, 2004, 2008). Hoechst 33342 at a final concentration of 0.12 µg/ml was added to the immunolabeled cells from cultured tubules to assess their DNA content.

After immunolabeling, cells were analyzed using a FACSVantage SE cell sorter (BD Biosciences, CA) equipped with an Enterprise II argon ion laser emitting simultaneously a 50 mw line tuned to UV (351 nm) and a second line tuned to 448 nm at 130 mw to respectively excite Hoechst and PE. Emission of PE fluorescence (λ.reem = 585 nm) was acquired after logarithmic amplification through a 585/40 nm filter. Emission of Hoechst 33342 fluorescence (λ.reem = 424 nm) was acquired after linear amplification through a 424/44 nm filter. Acquisition and analysis were performed using CellQuest ProTM 4.0.2 software. Analyses were performed as previously described in detail (Godet *et al.*, 2000). The vimentin-positive somatic cells and the vimentin-negative 4C, 2C, and 1C germ cells were separated with the bivariate analysis: DNA content/vimentin. Then, the bivariate linear forward light scatter and linear side angle light scatter analysis allowed the identification of young spermatocytes, middle-to-late pachytene spermatocytes, secondary spermatocytes, and round spermatids (Godet *et al.*, 2000).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS program (statistical package for the social sciences). Regression analysis with linear and quadratic correlation and the chi-square test were used. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Description of the First Meiotic Prophase In Vivo

In the adult rat. Studying the meiosis of adult rats (100 days old) by using the anti-SCP3 antibody provided a comprehensive description of the different substages of prophase I (Fig. 1). At leptotene stage, thin and discontinuous axial cores hold all the nucleus area (Fig. 1a). By the end of leptotene, some axial cores are grouped within a limited area (Fig. 1b). During zygotene, homologues have begun to come close

TABLE 2
Quantitative Aspects of the First Meiotic Prophase *In Vivo*

Age of rats (days)	Leptotene (%)	Zygotene (%)	Pachytene (%)	Diplotene (%)
23	18	15.7	65.1	1.2
42	3.7	12.5	67.8	16
100	2.3	8.1	83.1	6.5

Note. The proportions of leptotene, zygotene, pachytene, and diplotene spermatocytes were obtained in 23-, 42-, and 100-day-old rats after immunostaining by an anti-SCP3 antibody. Three rats of each age were sacrificed, and 1000 nuclei were analyzed for each age. The percentage of leptotene spermatocytes was significantly higher in 23-day-old rats than in 42- or 100-day-old rats ($p < 0.001$); no significant difference was observed for zygotene and pachytene nuclei for the three ages; the percentage of diplotene spermatocytes was significantly higher in the 42-day-old rats than in the other ages ($p < 0.01$). Results are the mean of 1000 nuclei from three rats of each age.

together and thin discontinuous axial cores coexist with short more intense stained synaptonemal complexes (SCs) (Fig. 1c). An asynchrony was observed in pairing progression between homologous chromosomes, some being partially paired, whereas others are still totally unsynapsed (Fig. 1d). At pachytene stage, all homologues are paired and 21 intensely stained SCs are clearly visible in each nuclei, one of which, the sexual bivalent, is easily identifiable by its peculiar configuration (Fig. 1e). Whereas a certain degree of condensation occurs during the pachytene stage, no condensed sex chromosomes are seen, as observed in the human species (Guichaoua *et al.*, 2005). At diplotene stage, lateral elements of SCs are separated, except at chiasma sites (Fig. 1f); the latter are preferentially located in the telomeric regions of the bivalents. At pachytene and diplotene stages, telomeres exhibit large attachment sites to the nuclear envelope. Quantitative analysis showed that leptotene spermatocytes were rare on the preparations (2.3%), the percentage of zygotene spermatocytes was 8.1%, pachytene was the most frequent stage (83.1%), and diplotene spermatocytes represented 6.5% (Table 2).

The three main types of SC abnormalities in pachytene nuclei were fragmented SC (Fig. 2a), asynapsed SC (Fig. 2b), and dotted SC, defined as regular discontinuities of SC and interpreted as defective condensation of SC (Fig. 2c). Each of them could be alone or associated with one or the two others. The most frequent abnormality was the fragmentation of the SC (9.3%), short asynapsis limited to few bivalents were less frequent (4.2%), and dotted SCs were rare on the preparations (0.4%) (Table 3).

In the 23- and 42-day-old rat. The same morphological stages than those in adult rat were observed but with different frequencies (Table 2). For the 23-day-old rats, spermatocytes at the leptotene stage were significantly more frequent than those in the adult rat (18 vs. 2.3%, $p < 0.001$). Zygotene stages seemed more frequent in young rats (15.7%) than those in the adult rat, but the difference was not significant. Similarly, the frequency of pachytene stages (65.1%) was lower but not significantly different from that of the adult rat. Diplotene stages were significantly less frequent (1.2%) than those in adult rat (6.5%, $p < 0.001$).

For the 42-day-old rats, the percentages of leptotene, zygotene, and pachytene spermatocytes (3.7, 12.5, and 67.8%, respectively) were not significantly different from those of the adult rat. By contrast, diplotene spermatocytes were significantly more numerous (16%) than those in the rats at the two other ages ($p < 0.01$).

As in the adult rat, the most frequent abnormality in the 23- and 42-day-old rats was fragmentation of the SC (10.5 and 8.5%, respectively). The frequencies of asynapsis were 3.7 and 3.9% for the 23- and 42-old-day rats, respectively, similar to the adult rat (Table 3). There was no significant difference between the percentages of these two abnormalities at the three ages studied. The percentage of dotted SC in 23-day-old rats was significantly higher than that in the 42- and 100-day-old rats (3.5 vs. 0.6% and 0.4%, respectively, $p < 0.001$).

Study of the Meiotic Prophase in Culture of Seminiferous Tubules

Time course of differentiation of BrdU-labeled germ cells. Culture of seminiferous tubules of 23-day-old rats with BrdU served to establish the kinetics of differentiation of

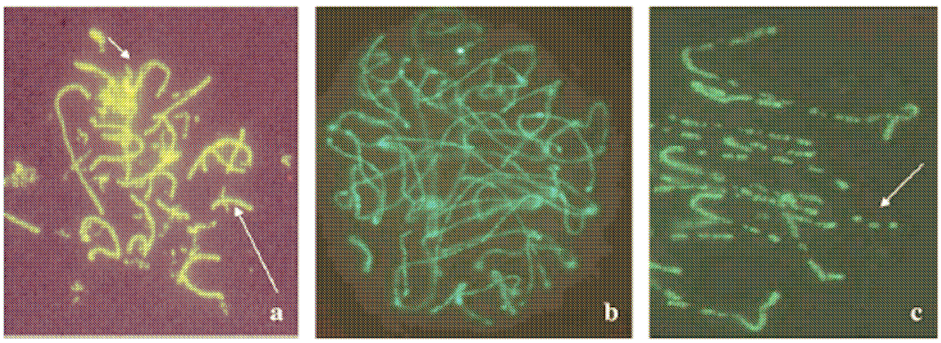


FIG. 2. The different types of SC abnormalities in rat pachytene nuclei. (a) Fragmentation (long arrow) of SC with asynapsed regions (short arrow). (b) Extended asynapsed regions. (c) Dotted SC (regular discontinuities of SC corresponding to defective condensation of SC).

TABLE 3
SC Abnormalities in Meiotic Prophase *In Vivo*

	23 days	42 days	100 days
% Nuclei with asynapsis	3.7	3.9	4.2
% Nuclei with fragmented SC	10.5	8.5	9.3
% Nuclei with dotted SC	3.5	0.6	0.4
Total % of abnormal nuclei	12	11	11

Note. For the three ages of rats, the percentage of nuclei with SC fragmentation was significantly higher than that with asynapsis and dotted SC ($p < 0.001$). The total percentage of abnormal nuclei did not significantly differ between the three ages studied. Results are the mean of 1000 nuclei from three rats of each age. SCs were immunostained by an anti-SCP3 antibody.

cultured germ cells (Fig. 3). Spread cells from two independent cultures were treated by dual-color immunocytochemistry. SCP3 labeling allowed the precise identification of each substage of prophase I, from leptotene to diplotene, and BrdU allowed to highlight the sequential appearance of the various substages. Spermatogonia and preleptotene spermatocytes were only labeled by the anti-BrdU antibody; no element of the SC was present at these two stages, which were therefore pooled. The same differentiation pattern was obtained in the two cultures. A small percentage of cells were BrdU positive in the two cultures (7.5%), but the total number of BrdU-labeled germ cells was sufficient to interpret the results.

The greatest number of BrdU-labeled spermatogonia/preleptotene spermatocytes was obtained on the first day of analysis, day 2 of culture (62%) (Fig. 3); then, it decreased until the end of the cultures as expected. BrdU-labeled leptotene spermatocytes were present from day 2 onward. Their proportion increased until day 7 (59%) and then decreased to disappear on day 14. Labeled zygotene nuclei were first observed on day 5 (13.3%); their percentage increased until day 9 (27%) and then decreased until day

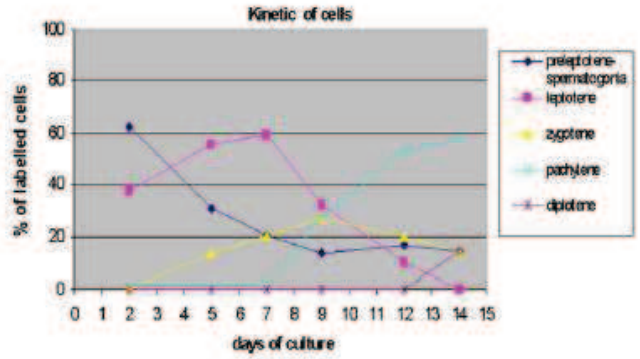


FIG. 3. Kinetics of spermatocyte differentiation *ex vivo*. Distribution profile of the five stages of the first meiotic prophase after double staining with anti-SCP3 and anti-BrdU antibodies. Spermatogonia and preleptotene spermatocytes are only stained by BrdU. Results are the mean of three to five pooled replicate culture wells in two different cultures. Three hundred nuclei were analyzed on each day in each culture. Each value is the mean of the results of the two cultures.

14 (14.3%). BrdU-labeled pachytene nuclei appeared on day 9 and were maximal on day 14 (53.3%). The first BrdU-labeled diplotene nuclei appeared at the end of the cultures: 14.3% on day 14.

Quantitative aspects of the first meiotic prophase. The greatest percentage of leptotene spermatocytes was obtained on day 5 of culture (15.5% ± 3.1) (Table 4). This percentage decreased significantly with time until the end of the cultures ($R = 0.90$, $p < 0.01$). Zygotene spermatocytes showed a parabolic evolution with a maximum on day 7 (25.2% ± 4.7, $R = 0.88$, $p < 0.05$). On day 7 of culture, a few zygotene nuclei with a polarized aspect in "bouquet" form were observed (Fig. 4a). This very transient stage in rats, corresponding to early zygotene (Zickler and Kleckner, 1998), was never observed on the meiotic preparations from the 100-day-old rats. The percentage of pachytene spermatocytes did not vary with time ($R = 0.32$, $p = 0.47$). The long duration of this stage, 11 days in rats, explains the stability of its percentage (from 54.3% ± 3.6 to 65.2%) throughout the culture. The mean percentage of diplotene spermatocytes showed a linear increase throughout the culture ($R = 0.98$, $p < 0.001$). A transient diplotene stage corresponding to early diplotene was observed in these *ex vivo* preparations displaying partial separation of homologues and long regions of bivalents still paired (Fig. 4b). These early diplotene represented roughly 20% of diplotene spermatocytes observed. Note that the percentages of the four stages were similar on the last day (D16) of culture of seminiferous tubules (Table 4) and in the 42-day-old rats (Table 2).

SC abnormalities in pachytene spermatocytes. The same abnormalities than *in vivo* were found but with different frequencies (Table 5). The percentage of abnormal nuclei showed a significant linear increase from D2 to D16 of culture ($R = 0.95$, $p < 0.01$). On day 2 of culture, the mean percentage of nuclei with fragmented SC (4.6%) was significantly lower than that observed *in vivo* in 23-day-old rats (10.5%, $p < 0.001$) (Table 3), whereas the mean percentage of nuclei with asynapsis was similar. These two abnormalities showed a significantly linear increase from day 5 to day 16 ($R = 0.97$, $p < 0.001$, for SC fragmentation; $R = 0.93$, $p = 0.02$, for asynapsis). From day 12 onward, the percentage of nuclei with fragmented SC became significantly higher in culture (14.5% ± 1.6) than *in vivo* ($p < 0.001$); nuclei with asynapsis became significantly higher in culture than *in vivo* from day 9 (12.2% ± 0.2) ($p < 0.001$). The percentage of nuclei with dotted SC was as low *ex vivo* as *in vivo* (Table 3); no linear increase was observed from D5 to D16.

Effect of Cr(VI) on the Meiotic Step Ex Vivo

Determination of chromium concentrations in the cultured cells. Our model of culture in bicameral chambers allows studying the effects of a toxic substance added to the basal compartment of the culture chamber in order to mimic what

TABLE 4
Quantitative Aspects of the First Meiotic Prophase *Ex Vivo* With and Without Cr(VI)

		D2	D5	D7	D9	D12	D14	D16
Control	Leptotene	15%	15.5% ± 2.2	7.7% ± 0.3	8.1% ± 1.3	4.4% ± 1.2	5.5%	4.3% ± 0.5
	Zygotene	16.2%	19.3% ± 2.8	25.2% ± 4.7	24.8% ± 5.7	20.2% ± 2.9	14%	14% ± 2.6
	Pachytene	65.2%	58% ± 5.7	60% ± 1.7	54.3% ± 3.6	57.6% ± 2.9	60%	60% ± 0
	Diplotene	3.6%	7.2% ± 1.2	7.1% ± 0.6	12.8% ± 2.1	17.8% ± 5.3	20.5%	21.7% ± 2.1
Cr(VI) 1 µg/l	Leptotene		11.4% ± 2.8	6.2% ± 2.9	4.7% ± 0.5	6.7% ± 1	3.5%	4% ± 0
	Zygotene		22.9% ± 6.4	22.4% ± 1.2	20% ± 2	16.3% ± 0.6	11%	15.3% ± 0.7
	Pachytene		59.6% ± 6.4	64.7% ± 4.7	63.8% ± 5	61.7% ± 1.7	66.5%	64% ± 0.7
	Diplotene		6.1% ± 2.8	6.7% ± 1.2	11.5% ± 2.5	15.3% ± 1.2	19%	16.7% ± 2.7
Cr(VI) 10 µg/l	Leptotene		14.5% ± 0.8	10.5% ± 1.7	7.2% ± 0.1	6.2% ± 0.6	6%	2.3% ± 0.5
	Zygotene		16.7% ± 6.4	20.3 ± 3	19.8% ± 1.1	15.2% ± 1.9	14%	14% ± 3
	Pachytene		63.3 ± 3.3	63% ± 2.7	61.5% ± 2.3	59.4% ± 3.3	58%	64.7% ± 1
	Diplotene		5.5% ± 0.5	6.2% ± 0.2	11.5% ± 1.3	19.2% ± 1.5	22%	19% ± 1.5
Cr(VI) 100 µg/l	Leptotene		12.2% ± 0.6	8% ± 0.7	5% ± 2	5% ± 0.9	3%	2.5% ± 0.5
	Zygotene		21.8% ± 3.1	22% ± 1.2	20.5% ± 1.5	15.2% ± 0.6	12%	16.5% ± 4.5
	Pachytene		59.3% ± 3.5	60.7% ± 0.6	59% ± 0	63.6% ± 0.3	62%	64% ± 0
	Diplotene		6.7% ± 0.2	9.3% ± 0.3	15.5% ± 1.5	16.2% ± 1.6	23%	17% ±4

Note. Analysis was performed in control cultures and in cultures with different concentrations of Cr(VI) in the culture medium. Spermatocytes were identified according to their staining with an anti-SCP3 antibody. Each value is the mean (±SEM) of three cultures except on days 2 and 14. In the control cultures, the percentage of leptotene stages decreased significantly from D5 to D16 ($R = 0.90$, $p < 0.01$). No linear correlation with time was observed for zygotene and pachytene stages. The percentage of diplotene spermatocytes increased significantly from D5 to D16 ($R = 0.98$, $p < 0.001$). The percentages of the four stages did not vary between control cultures and cultures with Cr(VI) whatever its concentration.

could happen *in vivo* in the testis. Indeed, the cellular junctions, between Sertoli cells and between germ cells and Sertoli cells, which are essential for spermatogenesis, are maintained in our cultures (Perrard *et al.*, 2009; Staub *et al.*, 2000). Therefore, before reaching the germ cells in our system, the toxic substance must cross the barrier of Sertoli cells (main component of the blood-testis barrier). Therefore, we assessed first whether Cr(VI) added to the basal compartment of the bicameral chamber could be detected in the cultured cells.

Cellular concentrations of chromium at selected days of cultures exposed to 1, 10, or 100 µg/l of the metal are presented in Table 6. In control cultures, no metal was detected as expected. By contrast, in the cell suspensions from cultures performed in the presence of Cr(VI), the cellular chromium concentration increased with the concentration of Cr(VI) in the basal culture medium.

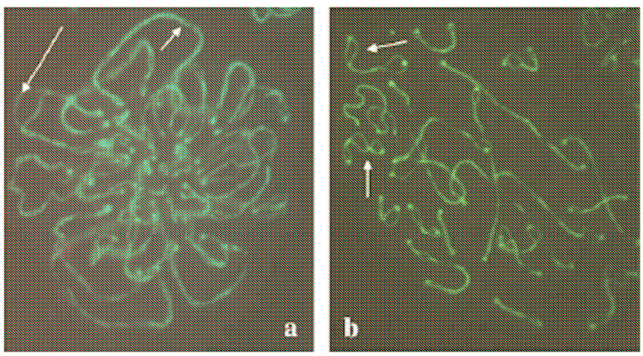


FIG. 4. Transient zygotene and diplotene stages observed only in *ex vivo* preparations. (a) "Bouquet form" zygotene nuclei labeled with the anti-SCP3 antibody showing SCs (short arrow) and continuous unpaired axial element (long arrow). (b) Early diplotene displaying partial separation of homologues (short arrow), whereas long regions of bivalents are still paired.

Effect of chromium on the number of Sertoli and meiotic cells in culture. The number of total cells decreased during the culture period as expected (Hue *et al.*, 1998; Staub *et al.*, 2000). Nevertheless, the number of cells per well was not affected by the presence of Cr(VI) irrespective of its concentration (Fig. 5). Flow cytometric analysis allowed refining these results (Fig. 6). The small decrease in the number of Sertoli cells, observed during the culture period, appeared not affected by any concentration of Cr(VI), whatever the day of sampling (107 ± 7% of the control values). Likewise, the number of young spermatocytes was roughly similar under control conditions and in cultures performed in the presence of Cr(VI) (88 ± 3%). Conversely, the numbers of middle-to-late pachytene spermatocytes (79 ± 3%), secondary spermatocytes (81 ± 2%), and round spermatids were somewhat lower in the presence of either concentration of Cr(VI) from day 4 onward; the amplitude of the decrease was more marked for *ex vivo*–formed round spermatids (65 ± 3% of control values).

Quantitative aspects of the first meiotic prophase in the presence of CR(VI). The repartition of the stages of the first meiotic prophase in cultures performed in the presence of the three concentrations of Cr(VI) is shown in Table 4. As in control cultures, the highest percentages of leptotene spermatocytes were obtained on day 5 of culture and then they decreased with time. These decreases were statistically

TABLE 5
SC Abnormalities During the First Meiotic Prophase *Ex Vivo* With and Without Cr(VI)

		D2	D5[a,b,c]	D7[a,b,c]	D9	D12[a,b,c]	D14[a,b,c]	D16[a]
Control	% Asynapsed	4.3%	4.9% ± 1.3	6.1% ± 1.6	12.2% ± 0.2	11% ± 1.5	11.7%	16.2% ± 0.4
	% Fragmented	4.6%	4.9% ± 0.2	6.8% ± 1.2	9.5% ± 0.3	14.5% ± 1.6	17.6%	17.7% ± 1.5
	% Dotted	0.6%	0	0.9% ± 0.2	0.5% ± 0.3	0.9% ± 0.5	0	3.8% ± 2.5
	% Of abnormal nuclei[d]	8%	9% ± 1.9	11% ± 0.8	15% ± 1.5	21% ± 3	19%	22% ± 2.5
Cr(VI) 1 µg/l	% Asynapsed		16.9% ± 2.4	21.9% ± 1.1	28% ± 0.1	28.6% ± 1.5	27.8%	26.2% ± 2.1
	% Fragmented		14.9% ± 1.6	14.1% ± 3.4	16.6% ± 4.4	25.7% ± 1.1	23.3%	21.2% ± 4.6
	% Dotted		1.5% ± 1	1.5% ± 0.7	1.8% ± 0.4	2.8% ± 0.2	3%	2.3% ± 0.1
	% Of abnormal nuclei[d]		30% ± 1.2	31% ± 3.2	38% ± 2.1	42% ± 3.4	39%	40% ± 1
Cr(VI) 10 µg/l	% Asynapsed		23.3% ± 1.6	26.9% ± 0.9	29.3% ± 5.1	38% ± 4.2	51.7%	29.4% ± 7.9
	% Fragmented		16.9% ± 2.8	19.6% ± 3.4	15.5% ± 5.7	31.3% ± 1.7	37.9%	25.8% ± 3.9
	% Dotted		0.4% ± 0.3	0.5% ± 0.2	0	1.7% ± 0.5	5.1%	0.5% ± 0.1
	% Of abnormal nuclei[d]		32% ± 2	41% ± 2	40% ± 4.6	58% ± 3.2	66%	57% ± 2.5
Cr(VI) 100 µg/l	% Asynapsed[d]		27.2% ± 2.3	31.9% ± 1.5	35.2% ± 2.1	40.9% ± 1.3	58.1%	57% ± 1.9
	% Fragmented[d]		20.5% ± 1.3	21.9% ± 2.9	23.7% ± 3.3	38.9% ± 4.6	56.5%	50.8% ± 1.1
	% Dotted		1.4% ± 0.7	0.8% ± 0.5	1.3% ± 0.5	0.6% ± 0.4	4.8%	3.1% ± 1.4
	% Of abnormal nuclei[d]		44% ± 2.2	52% ± 3.6	55% ± 3.7	64% ± 3.5	84%	76% ± 1.5

Note. SC abnormalities were analyzed in control cultures and in cultures performed in the presence of different concentrations of Cr(VI). Each value is the mean (± SEM) of three cultures except on days 2 and 14. The percentages of abnormal nuclei showed a significant linear increase from D5 to D16 for control cultures and for all concentrations of Cr(VI) ($p < 0.05$). This increase was significant for asynapsis and SC fragmentation for Cr(VI) 100 µg/l ($p < 0.05$). The percentage of abnormal nuclei also showed a linear increase with the concentration of Cr(VI) (from 1 to 100 µg/l) at each day of culture ($p \leq 0.05$) except on D9. This increase was significant for asynapsis and SC fragmentation ($p \leq 0.05$) from D5 to D14 except on D9. The percentage of dotted nuclei was not affected by chromium, whatever its concentration.

[a]Significant with Cr(VI) for abnormal nuclei.
[b]Significant for fragmented SC.
[c]Significant for asynapsis.
[d]Significant with days of culture.

significant for Cr 10 µg/l and Cr 100 µg/l ($R = 0.95$, $p < 0.01$ and $R = 0.93$, $p < 0.01$, respectively) and at the limit of significativity for Cr 1 µg/l ($R = 0.79$, $p = 0.057$). The percentages of zygotene and pachytene spermatocytes were stable throughout the culture for the three concentrations of Cr(VI). For diplotene spermatocytes, the same linear increase as in control was found with Cr 1 µg/l ($R = 0.93$, $p < 0.01$), Cr 10 µg/l ($R = 0.92$, $p < 0.01$), and Cr 100 µg/l ($R = 0.85$, $p < 0.05$). At each day of culture, the percentages of the four stages were similar irrespective of the concentrations of Cr(VI) (Table 4).

SC abnormalities in pachytene spermatocytes in the presence of Cr(VI). The results are shown on Table 5. The percentages of abnormal nuclei showed a significantly linear increase from D5 to D16 for the three concentrations of chromium ($R = 0.84$, $p < 0.05$; $R = 0.90$, $p < 0.05$; $R = 0.93$, $p < 0.01$; for 1, 10, and 100 µg/l, respectively). Asynapsis and

TABLE 6
Cellular Chromium Concentrations (nanograms per 10^6 cells) in Germ Cell Suspensions

Cr(VI) in culture medium (µg/l)	Cellular chromium concentration (ng/10^6 cells)		
	Days of culture		
	D5	D9	D16
0	< 0.1	< 0.1	< 0.1
1	0.35 ± 0.02	0.63 ± 0.03	1.18 ± 0.06
10	3.78 ± 0.19	1.95 ± 0.1	2.20 ± 0.11
100	3.00 ± 0.15	10.15 ± 0.51	12.25 ± 0.61

Note. Each value is the mean (±SEM) of triplicate determinations in two cultures.

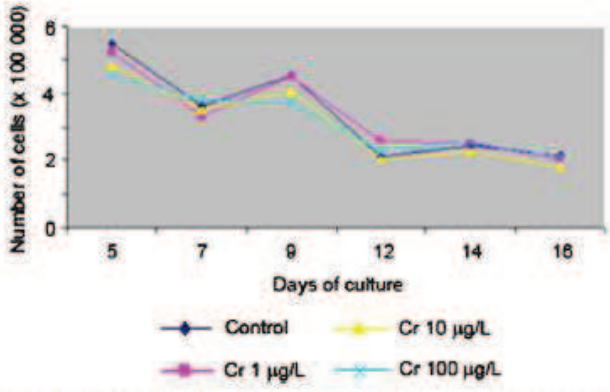


FIG. 5. Changes in the mean number of total cells by well in control cultures and in cultures with Cr(VI) at the three concentrations studied. Each value is the mean value of three cultures; for clarity, SEM has been omitted.

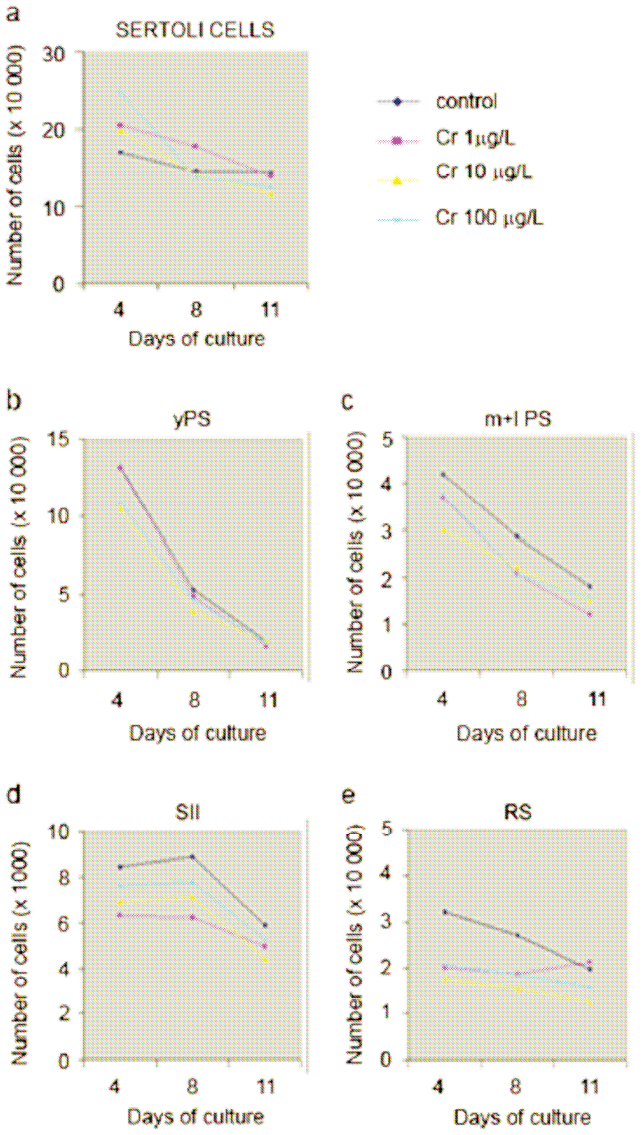


FIG. 6. Changes in the number of Sertoli cells and germ cells during a culture of testicular tubule segments from 23-day-old rats in the absence (control) or presence of Cr(VI) (1 or 10 or 100 µg/l). Sertoli cells (a). Young pachytene spermatocytes (yPS) (b). Middle-to-late pachytene spermatocytes (m + l PS) (c). Secondary spermatocytes (SII) (d). Round spermatids (RS) (e). Results are the mean of three wells per day for every condition. Similar results were obtained in another experiment.

fragmented SC were the most frequent abnormalities for the three concentrations of chromium, the frequencies of nuclei showing these two abnormalities increased with time, but this increase was significantly linear only for Cr(VI) 100 µg/l ($R = 0.95$, $p < 0.01$; $R = 0.92$, $p < 0.01$; respectively).

The percentage of abnormal nuclei increased from controls to Cr(VI) 100 µg/l for every day. The increase was linear and significant for D7, D12, D14, and D16 ($R = 0.98$, $p = 0.01$; $R = 0.97$, $p = 0.02$; $R = 0.99$, $p = 0.003$; and $R = 1$, $p < 0.001$; respectively) at the limit of significativity for D5 ($R = 0.95$, $p = 0.050$) and no significant for D9. The frequency of nuclei with asynapsis increased in the presence of chromium, and the increase was linear with the concentration and significant for D5, D7, D12, and D14 ($R = 0.97$, $p = 0.03$; $R = 0.95$, $p = 0.04$; $R = 0.94$, $p = 0.05$; and $R = 0.98$, $p = 0.02$; respectively) and no significant for D9 and D16. The frequency of nuclei with fragmented SC showed a linear increase with the concentration of chromium. This increase was significant for D7, D12, and D14 ($R = 0.97$, $p = 0.02$; $R = 0.99$, $p = 0.01$; and $R = 0.97$, $p = 0.02$; respectively) at the limit of significativity for D5 ($R = 0.94$, $p = 0.05$) and no significant for D9 and D16. The percentage of nuclei with dotted SC was not affected by chromium, whatever its concentration.

DISCUSSION

We have described a reliable *ex vivo* model for toxicological studies, allowing the study of the mechanisms by which environmental toxicants may interfere with the first prophase of meiosis. Our results demonstrate that the meiotic prophase is severely impaired by Cr(VI); the higher is the concentration, the more frequent are the abnormalities.

Validation of the System of Culture of Seminiferous Tubules for Meiotic Studies

We identified the four stages of the meiotic prophase I revealed by SCP3 labeling in adult rats. Our results on the chromosomal behavior from the leptotene to the diplotene stages are coherent with those obtained by Clermont (1972), Clermont and Perey (1957), and Scherthan and Schönborn (2001). The chronology of the *ex vivo* meiotic prophase, based on the double staining BrdU/SCP3 (Fig. 2), was in general accordance with the results of Hue *et al.* (1998), Staub *et al.* (2000), and Perrard *et al.* (2003). However, in our study, the percentage of BrdU-labeled spermatocytes was lower than that in the work of Staub *et al.* (2000) (7.5 vs. 53%). Two differences in the technical conditions should explain this discrepancy: (1) in Staub *et al.* (2000), germ cells were labeled *in vivo* and (2) the use of formamide in the present study, instead of NAOH, for denaturing chromatin before revelation of BrdU. The choice of a gentle denaturing procedure in this model was imposed by the necessity of protecting the SCP3 staining. The presence of BrdU-SCP3–labeled cells until the last day of culture is explained by the differentiation of BrdU-labeled spermatogonia in spermatocytes throughout the culture (Perrard *et al.*, 2003).

The sequential appearance of the different types of SCP3 and/or BrdU-labeled meiotic cells in culture from preleptotene to diplotene spermatocytes (Fig. 3) extends previous results from Perrard *et al.* (2003) as it shows that the kinetics of differentiation of the germ cells throughout the meiotic prophase *ex vivo* is close to that observed *in vivo*.

An important result of the present study is that the meiotic prophase that develops under our *ex vivo* conditions is similar

on many aspects to what happens in the testis *in vivo*. Different percentages of leptotene, zygotene, pachytene, and diplotene spermatocytes were observed *in vivo* between the 23-, 42-, and 100-day-old rats (Table 2). The percentages of leptotene and zygotene stages decreased inversely to the age of the rats, whereas the percentage of the pachytene stage increased with age (Table 2). A peculiar profile was found for the diplotene stage, whose frequency in the 42-day-old rats was higher than that in the 20- and 100-day-old rats; this could be explained by the progressive development of the spermatogenic process in the immature rats. At this age, spermatogenesis is not as efficient as that in the adult, which likely explains the accumulation of diplotene spermatocytes (Yang *et al.*, 1990). We showed here that there was no significant difference between the percentages of leptotene, zygotene, pachytene, and diplotene stages in the 42-day-old rats and on day 16 of culture of seminiferous tubules from 23-day-old rats. This reinforces the view that the development of the meiotic step in testes of pubertal rats is rather similar *in vivo* and *ex vivo* (Perrard *et al.*, 2003).

Another interesting point is that the cultures of seminiferous tubules revealed two short and specific transitional stages that are rarely observed *in vivo*: (1) several bouquet form zygotenes (Fig. 4a) observed on day 7 and (2) an early diplotene stage displaying partial separation of homologous chromosomes and long regions of bivalents still paired (Fig. 4b). Thus, not only do the conditions of seminiferous tubule cultures not modify the chronology of meiosis, the development of spermatocytes I *ex vivo* accurately reproducing their development *in vivo* but also the culture reveals stages too transitory to be easily seen *in vivo*.

Qualitative analysis of meiosis has shown that the same SC abnormalities are observed in rat and human meiosis (Geoffroy-Siraudin *et al.*, 2007; Tassistro *et al.*, 2009): asynapsis and fragmentation of SC and dotted SC. The percentage of asynapsed nuclei was the same on the first days of culture and during *in vivo* spermatogenesis for the three ages of rats studied. Then, from day 9 of the culture, this percentage increased significantly. This may be because of the *ex vivo* conditions, which may differ somewhat from the physiological conditions. It has been shown that a high number of asynapsed nuclei may result from a defective testicular environment (Guichaoua *et al.*, 2005; Tassistro *et al.*, 2009). The frequency of fragmented nuclei on the very first days of culture was significantly less than *in vivo* (Tables 3 and 5). This could be related to the decrease in the number of cells between days 2 and 5 (Hue *et al.*, 1998). Indeed, it could be hypothesized that spermatocytes with fragmented nuclei are rapidly lost during the first days of culture, as Sertoli cells are highly phagocytic (Byers *et al.*, 1993; Shiratsuchi *et al.*, 1999). The proportion of fragmented nuclei increased significantly with time of culture to become significantly higher than for *in vivo* spermatogenesis, reflecting likely some alterations of the spermatogenic process and/or Sertoli cells at the end of the culture. Dotted nuclei were the less frequent abnormality in rats, both *in vivo* and *ex vivo*, and there was no significant increase at the end of the culture. It stands to reason that culture of seminiferous tubules does not play a role in this SC defect interpreted as defective condensation of bivalents during the first stages of meiotic prophase. All these results should be taken into account for the use of this model in toxicological studies. Nevertheless, in toxicological studies, the results obtained with a toxicant are to be compared with those of the corresponding control cells.

Usefulness of This System of Culture for Toxicological Studies

Previous studies have shown that chromium exerts deleterious effect on spermatogenesis. Indeed, in the rat and in human, Cr(VI) reduces sperm counts and increases sperm abnormalities (Li *et al.*, 2001). Disruption in germ cell arrangement and spermatogenesis was described in the rat by Li *et al.* (2001) and in a nonhuman primate (*Macaca radiata* Geoffroy) by Aruldhas *et al.* (2005). Pereira *et al.* (2004) have demonstrated that Sertoli cells are affected by Cr(V) and these cells showing a large number of vesicles and vacuoles and that Cr(V) leads to the disruption of the blood-testis barrier. A significant reduction in semen quality is also observed in male welders occupationally exposed to chromium: decrease in sperm count, mobility and vitality, large number of morphologically abnormal spermatozoa, and these semen changes are dose dependent (Danadevi *et al.*, 2003).

Our study confirms and extends, by a new approach, these previous studies. Indeed, our system of culture allowed a better understanding of the mechanisms by which chromium impairs spermatogenesis, thanks to a precise quantitative and qualitative analysis of the first meiotic prophase. The presence of Cr(VI) in the cells exposed to the three concentrations indicates that this metal was able to run through the membrane partitioning the culture device and through the *ex vivo*–maintained blood-testis barrier (Perrard *et al.*, 2009; Staub *et al.*, 2000) because the metal was added only in the basal compartment of the bicameral chamber. As expected, the cellular chromium concentration increased with those of Cr(VI) in the culture medium.

Flow cytometric analysis revealed that the number of Sertoli cells and young spermatocytes appeared not greatly, if any, affected by either concentration of Cr(VI) (Figs. 6a and 6b), whereas the numbers of more differentiated cells, from middle spermatocytes to round spermatids were somewhat decreased (Figs. 6c–e). These results confirm the observations of Aruldhas *et al.* (2005) in electron microscopy, which also revealed that spermatogonia and preleptotene spermatocytes exhibited little pathological changes in response to Cr(VI), whereas pachytene spermatocytes had fragmented and discontinuous chromatin. In our study, immunostaining of SC with an anti-SCP3 antibody revealed that the chronology of the prophase I stages was not affected by Cr(VI) whatever its concentration but that there was a significant increase of total

abnormalities of the SC, in parallel with the concentrations of chromium because of increased numbers of asynapsis and fragmented SC. Thus, SC abnormalities visible at the pachytene stage demonstrate that alteration of the spermatogenic process was already present in pachytene exposed to Cr(VI). SC analysis is a highly sensitive indicator of potentially heritable effects of the genotoxic agents (Backer *et al.*, 1988). In previous studies, all tested agents caused dose-dependent SC damages: breakage, asynapsis, and synapsis irregularities, which varies among the chemical (Allen *et al.*, 1988a,b; Backer *et al.*, 1988). Thus, this study shows that Cr(VI) is toxic for the meiotic cells even at low concentrations.

It appears therefore that quantitative studies are not sufficient to estimate the effects of toxicants on the germ cells and that a fine qualitative analysis is essential to approach the mechanisms by which toxicants may act on spermatogenesis. The arsenal of specific antibodies that permits detection of individual proteins of the meiotic prophase may be applied to this model, which also lends itself to other tests of mutagenesis and toxicity (Perrin *et al.*, 2007) for a better understanding of the impacts of our environment on fertility.

FUNDING

CNRS, INRA, the University Claude Bernard Lyon I, the Ecole Normale supérieure de Lyon, and the University of Méditerranée.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr O. Sabido, Centre Commun de Cytométrie en Flux, Faculté de Médecine, Université Jean Monnet St-Etienne France, for help with cytometry analysis.

REFERENCES

Allen, J. W., Gibson, J. B., Poorman, P. A., Backer, L. C., and Moses, M. J. (1988a). Synaptonemal complex damage induced by clastogenic and antimitotic chemicals implications for non-disjunction and aneuploidy. *Mutat. Res.* **201,** 313–324.

Allen, J. W., Poorman, P. A., Backer, L. C., Gibson, J. B., Westbrook-Collins, B., and Moses, M. J. (1988b). Synaptonemal complex damage as a measure of genotoxicity at meiosis. *Cell Biol. Toxicol.* **4,** 487–494.

Aruldhas, M. M., Subramanian, S., Vengatesh, G., Chandrahasan, G., Govindarajulu, P., and Akbarsha, M. A. (2005). Chronic chromium exposure induced changes in testicular histoarchitecture are associated with oxidative stress: study in a non-human primate (Macaca radiata Geoffroy). *Hum. Reprod.* **20,** 2801–2813.

Backer, L. C., Gibson, J. B., Allen, J. W., and Moses, M. J. (1988). Synaptonemal complex damage in relation to meiotic chromosome aberrations after exposure of male mice to cyclophosphamide. *Mutat. Res.* **203,** 317–330.

Barceloux, D. G. (1999). Chromium. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **37,** 173–194.

Byers, S., Jegou, B., MacCalman, C., and Blaschuk, O. (1993). Sertoli cell adhesion molecules and the collective organization of the testis. In *Sertoli Cell* (L. D. Russell and M. D. Griswold, Eds.), pp. 461–476. Cache River Press, Clearwater, FL.

Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., and Skakkebaek, N. E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* **12,** 609–613.

Chardin, B., Dolla, A., Chaspoul, F., Fardeau, M. L., Gallice, P., and Bruschi, M. (2002). Bioremediation of chromate: thermodynamic analysis of the effects of Cr(VI) on sulphate reducing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60,** 352–360.

Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* **52,** 198–236.

Clermont, Y., and Perey, B. (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am. J. Anat.* **100,** 241–267.

Danadevi, K., Rozati, R., Reddy, P. P., and Grover, P. (2003). Semen quality of Indian welder occupationally exposed to nickel and chromium. *Reprod. Toxicol.* **17,** 451–456.

Fouchécourt, S., Godet, M., Sabido, O., and Durand, P. (2006). Glial cell-line-derived neurotropic factor and its receptors are expressed by germinal and somatic cells of the rat testis. *J. Endocrinol.* **190,** 59–71.

Geoffroy-Siraudin, C., Aknin-Seiffer, I., Metzler-Guillemain, C., Ghalamoun-Slaimi, R., Bonzi, M. F., Levy, R., and Guichaoua, M. R. (2007). Meiotic abnormalities in patients bearing complete AZFc deletion of Y chromosome. *Hum. Reprod.* **22,** 1567–1572.

Godet, M., Damestoy, A., Mouradian, S., Rudkin, B., and Durand, P. (2004). Key role for cyclin dependant kinases in the first and the second meiotic divisions of rat spermatocytes. *Biol. Reprod.* **70,** 1147–1152.

Godet, M., Sabido, O., Gilleron, J., and Durand, P. (2008). Meiotic progression of rat spermatocytes requires mitogen-activated protein kinases of Sertoli cells and close contacts between the germ cells and the Sertoli cells. *Dev. Biol.* **315,** 173–188.

Godet, M., Thomas, A., Rudkin, B., and Durand, P. (2000). Developmental changes in cyclin B1 and cyclin-dependant kinase 1 (CDK) levels in the different populations of spermatogenic cells of the post-natal rat testis. *Eur. J. Cell Biol.* **79,** 816–823.

Guichaoua, M. R., Perrin, J., Metzler-Guillemain, C., Sais-Magnan, J., Giorgi, R., and Grillo, J. M. (2005). Meiotic anomalies in infertile men with severe spermatogenic defects. *Hum. Reprod.* **20,** 1897–1902.

Hartung, T., and Rovida, C. (2009). Chemical regulators have overreached. *Nature* **460,** 1080–1081.

Hue, D., Staub, C., Perrard-Sapori, M. H., Weiss, M., Nicolle, J. C., Vigier, M., and Durand, P. (1998). Meiotic differentiation of germinal cells in three-week cultures of whole cell population from rat seminiferous tubules. *Biol. Reprod.* **59,** 379–387.

Irvine, S., Cawood, E., Richardson, D., Macdonald, E., and Aitken, J. (1996). Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ* **312,** 467–471.

Jensen, T. K., Sobotka, T., Hansen, M., Tonnes Pedersen, A., Lutz, W., and Skakkebaek, N. (2008). Declining trends in conception rates in recent birth cohorts of native Danish women: a possible role of deteriorating male reproductive health. *Int. J. Androl.* **31,** 81–92.

Kawanishi, S., Inoue, S., and Sano, S. (1986). Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **261,** 5952–5958.

Lackner, J., Schatzl, G., Waldhor, T., Resh, K., Kratzik, C., and Marberger, M. (2005). Constant decline in sperm concentration in infertile males in a urban population: experience over 18 years. *Fertil. Steril.* **84,** 1657–1661.

Li, H., Chen, Q., Li, S., Yao, W., Li, L., Shi, X., Wang, L., Castranova, V., Vallyathan, V., Ernst, E., *et al.* (2001). Effect of Cr(VI) exposure on sperm quality: human and animal studies. *Ann. Occup. Hyg.* **45,** 505–511.

Martin, R. (2006). Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reprod. Toxicol.* **22,** 142–147.

Metzler-Guillemain, C., and Guichaoua, M. R. (2000). A simple and reliable method for meiotic studies on testicular samples used for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* **74,** 916–919.

Morris, B. W., Griffiths, H., and Kemp, G. J. (1988). Effect of glucose loading on concentrations of chromium in plasma and urine of healthy adults. *Clin. Chem.* **34,** 1114–1116.

Pedersen, F., de Bruijn, J., Munn, S., and Van Leeuwen, K. (2003). Assessment of additional testing needs under REACH_effects of (Q)SARs, risk based testing and voluntary industry initiatives. *JRC Report EUR* **20863,** 33.

Pereira, M. L., Santos, T. M., and Garcia e Costa, F. (2004). Pedrosa de Jesus, J. (2004). Functional changes of mice Sertoli cells induced by Cr(V). *Cell Biol. Toxicol.* **20,** 285–291.

Perrard, M. H., Hue, D., Staub, C., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., and Durand, P. (2003). Development of the meiotic step in testes of pubertal rats: comparison between the in vivo situation and under ex vivo conditions. *Mol. Reprod. Dev.* **65,** 86–95.

Perrard, M. H., Prisant, N., Geoffroy-Siraudin, C., Segretain, D., Pointis, G., Guichaoua, M. R., and Durand, P. (2009). Analysis on the intra-testicular control of spermatogenesis by ex-vivo approaching. *Folia. Histochem. Cytobiol* **47,** S89–S94.

Perrin, J., Lussato, D., De Meo, M., Durand, P., Grillo, J. M., Guichaoua, M. R., Botta, A., and Bergé-Lefranc, J. L. (2007). Evolution of DNA strand-breaks in cultured spermatocytes: the comet assay reveals differences in normal and irradiated germ-cells. *Toxicol Ex Vivo* **21,** 81–89.

Scherthan, H., and Schönborn, I. (2001). Asynchronous chromosome pairing in male meiosis of the rat (rattus norvegicus). *Chromosome Res.* **9,** 273–282.

Shiratsuchi, A., Kawasaki, Y., Ikemoto, M., Arai, H., and Nakanishi, Y. (1999). Role of class B scavenger receptor type I in phagocytosis of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells. *J. Biol. Chem.* **26,** 5901–5908.

Staub, C., Hue, D., Nicolle, C., Perrard-Sapori, M. H., Segretain, D., and Durand, P. (2000). The whole meiotic process can occur ex vivo in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp. Cell Res.* **260,** 85–95.

Tassistro, V., Ghalamoun-Slaimi, R., Sais-Magnan, J., and Guichaoua, M. R. (2009). Chronology of meiosis and synaptonemal complex abnormalities in normal and abnormal spermatogenesis, a new index in the evaluation of spermatogenesis quality. *Indian J. Med. Res.* **2009,** 268–278.

Von Burg, R., and Liu, D. (1993). Chromium and hexavalent chromium. *J. Appl. Toxicol.* **13,** 225–230.

Yang, Z. W., Wreford, N. G., and de Kretser, D. M. (1990). A quantitative study of spermatogenesis in the developing rat testis. *Biol. Reprod.* **43,** 629–635.

Zickler, D., and Kleckner, N. (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu. Rev. Genet.* **32,** 619–697.

III- Impact du Cadmium (Cd) sur la spermatogenèse du rat obtenue ex-vivo (article en cours de rédaction)

1- Introduction

a- Caractéristiques du cadmium (Cd)

Le Cadmium est un métal lourd, de symbole Cd et de numéro atomique 48. C'est un métal blanc, mou et malléable qui ternit au contact de l'air, ayant les mêmes propriétés physiques et chimiques que celles du zinc. Lors de son ébullition, il dégage des vapeurs jaunes toxiques. L'ion cadmium s'oxyde très peu à température ambiante et brûle dans l'air en donnant l'oxyde anhydre CdO. Les principaux composés minéraux du cadmium sont l'oxyde de cadmium, le chlorure de cadmium, le bromure de cadmium, le nitrate de cadmium, le sulfure de cadmium et le séléniure de cadmium. Il est l'un des rares éléments n'ayant aucune fonction connue dans le corps humain ou chez l'animal (Benoff et coll. 2008). Le cadmium est naturellement largement présent dans notre environnement à de faibles concentrations souvent couplé à des minerais de zinc, plomb ou cuivre. (Thompson et coll. 2008).

b- Sources d'exposition

Nous sommes tous exposés au Cd via notre alimentation, l'eau que nous buvons ou l'air que nous respirons. Certains produits comme le riz, les coquillages ou les abats concentrent particulièrement le Cd (Watanabe et coll. 1984 ; Jarup et coll. 1998). Dans les pays européens, la consommation alimentaire de cadmium est estimée entre 10 et 30 µg par jour (Nasreddine et coll. 2002), ce qui reste très en dessous des recommandations de l'OMS

fixées actuellement à 500 µg par semaine (WHO, 1992). Cependant, il existe de grandes variations individuelles dans le taux d'absorption digestive du Cd qui est de 5% en moyenne mais qui peut atteindre 30% chez certains individus (Satarug et coll. 2004).

Les activités industrielles humaines s'ajoutent au cadmium naturellement présent dans notre environnement. Le cadmium entre dans la composition d'alliages pour les câbles électriques, les roulements à billes. Il est employé pour la fabrication des batteries et accumulateurs, pour le revêtement anti-corrosion des métaux. On l'utilise aussi dans les peintures et colorants, les écrans de télévision, les engrais phosphorés. Il est présent dans les fumées et les poussières de certaines industries (métallurgie, recyclage des batteries d'accumulateurs, des piles rechargeables), les cendres et résidus d'incinérations issus de la combustion de déchets contenant du Cd (PVC, peinture….) (Muntau et coll. 1992).

En dehors de ces contaminations liées aux activités humaines, la principale source d'exposition au cadmium reste le tabagisme, avec une estimation de 0.2 à 1 µg de Cd assimilé pour chaque cigarette fumée (Nandi et coll. 1969 ; Elinder et coll. 1983). Les gros fumeurs peuvent ainsi ingérer le double de la dose maximale recommandée par l'OMS (Waalkes et coll. 2003 ; ATSDR 2008).

c- Toxicité

¤ *Toxicocinétique*

La toxicité du Cd est connue depuis les années 50 sous toutes ses formes (métal, vapeur, sels et composés organiques). Il circule dans le sang en grande partie lié à l'hémoglobine. Il se fixe ensuite aux groupements SH d'une protéine de transport et de stockage, la métallothionéine dont il induit la synthèse cellulaire. Puis il se fixe de façon diffuse dans l'organisme, surtout au niveau du rein, du foie et des poumons. Le Cd a une demi-vie longue (20 à 40 ans chez l'homme) et s'accumule dans l'organisme sur de longues

périodes pour atteindre chez l'homme adulte des taux de 30 à 40 mg. L'élimination naturelle, très lente, par les urines, les selles, l'éjaculation, la sueur et la salive ne compense pas les apports (< 1 à 2 µg/jour) (Goering et coll. 1995, Harbison et coll. 1998).

¤ *Mécanisme d'action toxique*

- ✓ Une intoxication aiguë par inhalation de vapeurs et de fumées d'oxyde de cadmium peut être à l'origine d'une pneumopathie pouvant se compliquer un œdème du poumon pouvant être létal. Mais les principaux risques d'intoxications sont les expositions prolongées à de faibles doses (Danielsson et coll. 1984, Oldereid et coll 1993).
- ✓ Une intoxication chronique au cadmium est nocive, le cadmium étant un toxique cumulatif dans les chaînes alimentaires. Elle perturbe divers métabolismes et peut entraîner :
  - des lésions rénales, qui peuvent se compliquer d'une néphropathie irréversible.
  - des lésions dentaires, qui se manifestent par une coloration jaune du collet des dents.
  - des lésions osseuses, avec ostéomalacie et déminéralisation, causes de fractures spontanées.
  - de l'emphysème pulmonaire.
- ✓ Il pourrait être impliqué dans le développement de plusieurs cancers : rein, foie, prostate (Waalkes et coll. 2003 ; Goyer et coll. 2004 ; Thompson et Bannigan 2008). L'IARC (International Agency for Research on Cancer) a classé le Cd comme cancérogène connu chez l'homme depuis 1993 et il est en 7ème position dans la « Priority List of Hazardous Substances » établie par l' »Agency for Toxic Sustances and Disease Registry » (ATSDR, 2007). Ces dernières années, les agences gouvernementales et internationales ont multiplié les efforts pour contrôler le niveau d'exposition au Cd de la population générale.

¤ *Cadmium et Fertilité*

Plusieurs études ont retrouvé de fortes concentrations de cadmium dans le liquide séminal, le sang et les urines d'hommes infertiles (fumeurs et non fumeurs) présentant une oligo-asthénospermie (Benoff et coll. 1997, Benoff et coll. 2007, Chia et coll. 1992, Marmar et coll. 2005, Pant et coll. 2003). Le cadmium s'accumule dans les organes génitaux où on le retrouve à l'état de traces (Danielson et coll. 1984, Oldereid et coll. 1993). Son effet cytotoxique retentit sur la spermatogenèse et est responsable d'une altération des paramètres du sperme L'exposition au Cadmium chez des hommes tabagiques s'accompagne d'une diminution du volume testiculaire, du volume de l'éjaculat, de la numération et de viabilité des spermatozoïdes (Al Bader et coll. 1999). Il a un effet inducteur de l'apoptose sur les cellules germinales (Benoff et coll. 2004), en particulier sur les cellules germinales foetales (Angenard et coll. 2010). Le cadmium peut être responsable d'une asthénospermie en provoquant des anomalies du cytosquelette des spermatozoïdes. C'est aussi un compétiteur connu des ions calcium (Ca+) qui jouent un rôle fondamental dans la régulation de la mobilité des spermatozoïdes. Celle-ci est normalement contrôlée par le complexe AMPc/PKA et le Ca+ qui interviennent dans la phosphorylation-déphosphorylation des protéines de la membrane plasmique du spermatozoïde. Le cadmium entraîne une altération des canaux calciques provoquant la pénétration d'une quantité importante du toxique dans le cytoplasme des cellules, augmentant ainsi son effet cytotoxique (Turner et coll. 2003, Luconi et coll. 2006). D'autres études ont montré que le cadmium pouvait entraîner une altération de la qualité des spermatozoïdes par altération de la réaction acrosomique. Enfin, une présence excessive de cadmium dans les testicules serait impliquée dans l'infertilité associée au varicocèle (Benoff et coll. 1997).

Des effets testiculaires ont été démontrés chez l'animal à fortes doses expérimentales (Kotsonis et coll. 1977 ; Berliner et coll. 1975). Les premiers travaux s'intéressant aux effets testiculaires du cadmium montrent des lésions vasculaires irréversibles dans les testicules de

mammifères exposés, avec une dissociation des cellules endothéliales vasculaires, un œdème et des hémorragies (Parizek et coll. 1960, Mason et al. 1964) responsables d'ischémie testiculaire et de nécrose (Chiquoine et coll. 1964; Chia et coll. 1994). Des lésions des tubes séminifères touchant les spermatocytes I et II, les spermatides et les cellules de Sertoli, sans lésion des cellules de Leydig ont été décrites (Lymberopoulos et coll. 2000). Chez le rat, l'injection intra-testiculaire de fortes doses de cadmium engendre une dégénérescence des cellules germinales et des cellules de Leydig entraînant une déficience de production d'androgène (Al-Bader et coll. 1999). On note aussi une atrophie testiculaire et la production d'anticorps anti-spermatozoïdes. Plus récemment Chung et Cheng (2001) ont montré que le cadmium altérait sévèrement les jonctions serrées, GAP jonctions et spécialisations ectoplasmiques de l'épithélium séminifère conduisant à une rupture de la barrière hémo-testiculaire pourtant indispensable à la différenciation des cellules germinales à l'abri du système immunitaire (pour revue : Siu et coll. 2009).

Deux études ont été consacrées aux effets du cadmium sur la gonade foetale. Tam et Liu (1985) ont montré une diminution de la taille de la crête génitale, un retard à la migration des cellules germinales dans les crêtes génitales entraînant une déplétion en cellules germinales, un défaut de maturation des gamètes, et une hypofertilité. Dans l'étude d'Angenard et coll (2010), réalisée sur du testicule foetal humain, l'étude immunohistochimique révèle une diminution de 20% des cellules germinales et une augmentation de l'apoptose de 2 à 8%, détectée par le clivage de la caspase-3.

Notre travail a pour objectif de clarifier les mécanismes d'action du cadmium sur la spermatogenèse. Comme précédemment pour le chrome (VI), nous disposons d'un outil de culture reproduisant parfaitement la spermatogenèse du rat ce qui va nous permettre d'évaluer précisément l'effet du cadmium sur les cellules méiotiques obtenues ex-vivo.

2- Matériel et méthodes

a- Cultures de tubes séminifères de rat

Comme lors des travaux réalisés en présence de chrome (VI), nous utilisons le modèle de culture de tubes séminifères en chambre bicamérale développé par l'équipe du Dr Durand. Nous avons réalisé 3 séries de culture en l'absence ou en présence de Cadmium. Les 2 premières séries de culture ont été faites sur 17 jours, la 3ème culture a été prolongée jusqu'au 25ème jour. Le cadmium a été ajouté à J2 de culture et à chaque renouvellement du milieu basal (toutes les 48h): une solution stock de chlorure de cadmium à 100mg/L (CdcC12, Sigma Aldrich) a été diluée dans le milieu de culture pour obtenir une concentration finale de Cd de 0.1 µg/L, 1 µg/L et 10 µg/L. Ces concentrations ont été choisies pour être cohérentes avec les niveaux d'exposition environnementale au Cadmium et les taux retrouvés dans les liquides biologiques d'individus exposés (Elkin et coll. 2010, Pant et coll. 2003).

Aux jours sélectionnés de culture (J5, J7, J10, J12, J14, J17, et J22 et J25 pour la 3ème culture), les cellules sont détachées de la membrane perméable de la chambre bicamérale par action de la trypsine. Un aliquot de la suspension cellulaire est utilisé pour vérifier le nombre et la vitalité cellulaire par le test au bleu trypan. Un aliquot est fixé dans de l'éthanol à 70% pour l'analyse en cytométrie de flux. Les suspensions cellulaires restantes sont congelées à -80°C dans du milieu de culture supplémenté avec 10% de glycérol.

b- Analyse en Cytométrie de Flux

Afin de différencier les cellules germinales des cellules de Sertoli, ces dernières sont marquées avec un anticorps anti-vimentine révélé par un AC secondaire anti-souris conjugué

à la phycoerythrine (PE) (Godet et coll, 2000, 2004, 2008). D'autre part, la ploïdie des cellules est établie en colorant les noyaux cellulaires avec une solution d'Hoeschst 33342 à une concentration finale de 0,12 µg/mL.

Après immuno-marquage, les cellules sont analysées en cytométrie de flux (Laser Argon Enterprise II). Nous séparons les cellules positives à la vimentine qui correspondent aux cellules de Sertoli et celles négatives à la vimentine dont le contenu en ADN, 4C, 2C ou 1C est visualisé par la coloration de l'Hoeschst 33342. Nous identifions ainsi les différents types de cellules germinales : spermatogonies, jeunes spermatocytes I, spermatocytes I pachytènes plus tardifs, spermatocytes II et spermatides rondes. (Godet et coll. 2000, Geoffroy-Siraudin et coll. 2010).

c- Méthodes cytologiques

Pour réaliser les techniques d'immunocytochimie, les suspensions cellulaires ont tout d'abord été préfixées à la paraformaldéhyde à 0.1% pendant 5 minutes puis étalées par cytocentrifugation à 600 tours/minute.

Nous avons utilisé un anticorps polyclonal de lapin anti-SCP3 (Abcam, UK) révélé par un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la fluorescéine (FITC), pour marquer les éléments axiaux et latéraux des CS selon la technique décrite par Metzler-Guillemain et Guichaoua, (2000) et présentée dans la partie « matériels et méthodes » de cette thèse.

d- Analyse au microscope

Les noyaux des spermatocytes sont analysés grâce à un microscope à fluorescence Axioplan (Zeiss, Germany) couplé à une caméra numérique Olympus DP71.

Deux cents noyaux ont été analysés pour chaque jour de culture sauf à J25 où la richesse des lames n'a permis une analyse que sur 100 noyaux. Dans les cultures témoins et dans celles en présence de cadmium, nous avons évalué :

- Les pourcentages respectifs des différents stades de prophase I : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène.
- Le pourcentage de spermatocytes au stade pachytène présentant des anomalies des CS : fragmentation, asynapsis, images en pointillés, aspect mité. Cette dernière anomalie est décrite pour la première fois dans ce travail. Elle correspond à une coloration non homogène des CS liée à la présence de très nombreuses petites lacunes non colorées par le fluorochrome. Ces différentes anomalies peuvent isolées ou associées entre elles. Pour chaque jour de culture, nous avons calculé le pourcentage total de spermatocytes anormaux (porteur d'une ou plusieurs anomalies).

e- Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel SPSS. Nous avons utilisé des tests de régression linéaire et des tests de « Chi-2 » et « t de student » considérés comme significatifs lorsque $p< 0,05$.

3- Résultats

a- Effet du cadmium sur la richesse cellulaire (Figure 18)

Une analyse globale montre que le nombre total de cellules en culture diminue avec le temps de culture comme dans les travaux de Hue et coll. (1998) et Staub et coll. (2000) sans influence apparente de la concentration de cadmium.

Cependant, l'analyse détaillée en cytométrie de flux montre que le cadmium a un impact très différent selon le type cellulaire étudié. Nous observons que le cadmium n'a pas d'effet sur le nombre de cellules de Sertoli (105.9 $\pm$ 7.6% des valeurs contrôles dans la culture avec 1 µg/L et 97.7 $\pm$ 3.3% des valeurs contrôle dans la culture avec 10 µg/L de Cd) mais diminue le nombre de cellules germinales de manière dose dépendante (Fig 18a et 18b). Le nombre de cellules obtenues dans la culture avec 10 µg/L de cadmium est toujours inférieur à celui obtenu dans celle avec 1 µg/L. L'effet du cadmium sur le nombre de cellules germinales dépend du niveau de différenciation des cellules. Une analyse globale montre que le cadmium diminue le nombre de cellules germinales totales obtenues (88.2 $\pm$ 4.1% des valeurs contrôles dans la culture avec 1 µg/L et 80.4 $\pm$ 4.3% des valeurs contrôle dans la culture avec 10 µg/L de Cd). L'analyse plus précise montre que le cadmium est très délétère sur les spermatogonies ainsi que sur les cellules les plus différenciées, les spermatides rondes, alors que son impact est moindre sur les cellules intermédiaires. Le nombre de spermatogonies n'atteint que 86.1 $\pm$ 2.4% des valeurs contrôles dans les cultures à 1 µg/L de Cd et 84.7 $\pm$ 6.3% des valeurs contrôles dans celles à 10 µg/L (Fig 18c). Le nombre de spermatocytes I jeunes et pachytènes tardifs (fig 18d et 18e) et spermatocytes II (Fig 18f) est peu influencé par la présence du cadmium quelque soit sa concentration (de 88.5 $\pm$ 4.6% à 90.1 $\pm$ 9.8% des valeurs contrôles selon le type cellulaire pour la plus forte concentration). C'est au niveau du nombre de spermatides rondes obtenues que la décroissance en présence de cadmium est la plus marquée : 84.8 $\pm$ 4.8% des valeurs contrôles dans la culture avec 1 µg/L et 75.3 $\pm$ 4.5% des valeurs contrôles dans la culture avec 10 µg/L de Cd (Fig 18g)

Figure 18: Evolution du nombre de cellules de Sertoli et cellules germinales au cours de la culture de tubes séminifères de rat en l'absence (contrôle) ou en présence de cadmium (1 µg/L et 10 µg/L). Cellules de Sertoli (18a). Cellules germinales totales (18b). Spermatogonies (18c). Jeunes spermatocytes I (18d). Spermatocytes I pachytènes tardifs (18e). Spermatocytes II (18f). Spermatides rondes (18g). Les résultats présentés sont ceux de l'une des 3 séries de cultures, des données similaires ont été obtenues avec les 2 autres séries.

Fig 18a: Cellules de Sertoli

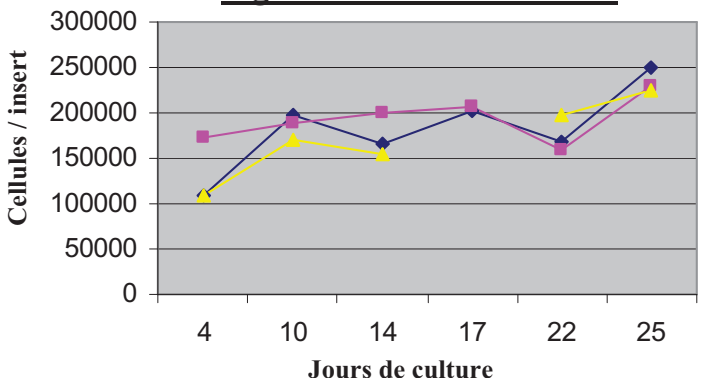


Fig 18b: Cellules Germinales

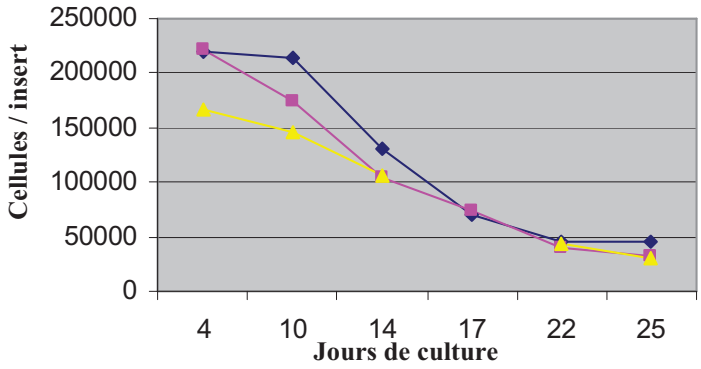


Fig 18c: Spermatogonies

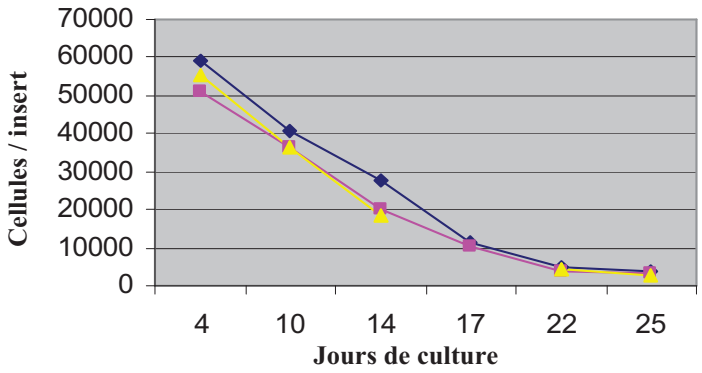


Fig 18d: Jeunes Spermatocytes I

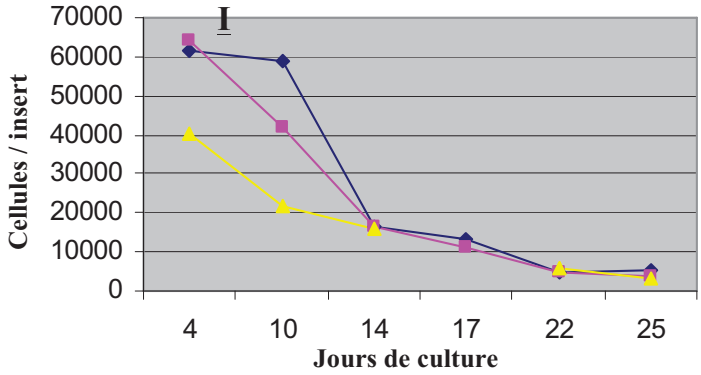


Fig 18e: Spermatocytes I pachytènes tardifs

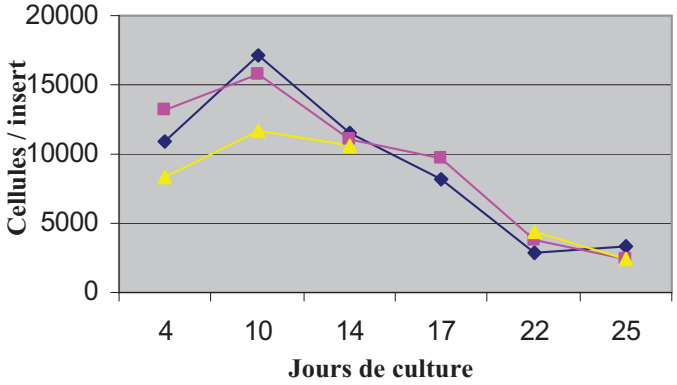


Fig 18f: Spermatocytes II

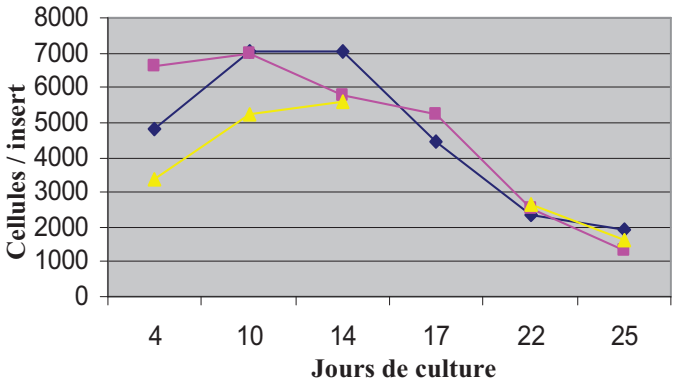
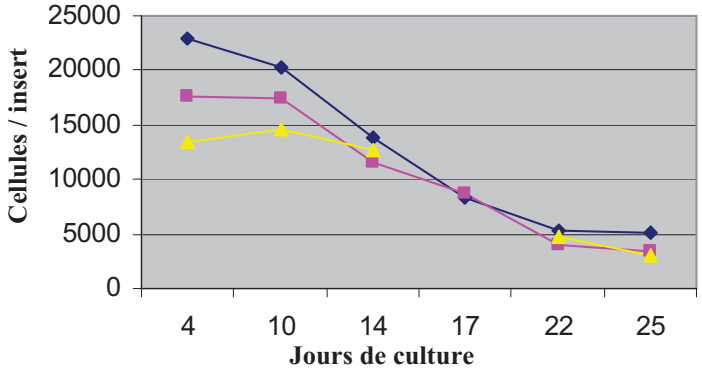
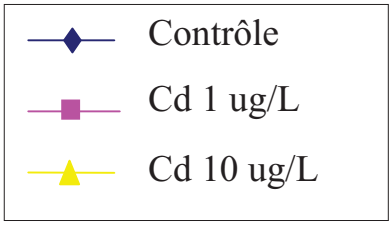


Fig 18g: Spermatides Rondes





b- Chronologie de la prophase de première division méiotique en présence de Cadmium

Nous retrouvons dans les cultures témoins, la même chronologie méiotique que celle observée précédemment dans le travail réalisé en présence de Cr(VI) (Tableau A). Le pourcentage de spermatocytes au stade leptotène est maximal au début de la culture (14.9% $\pm$ 0.8 à J5) puis décroît significativement jusqu'au dernier jour de culture analysé (0% à J25) (R^2= 0.816; p=0.002). Le pourcentage de noyau au stade zygotène montre une évolution parabolique avec un maximum à J7 puis une décroissance jusqu'à J25 (R^2= 0.882; p=0.001) tandis que les spermatocytes plus tardifs au stade diplotène augmentent durant les 3 semaines de culture pour passer de 5.2% $\pm$ 3 à J5 à 30% à J25 (R^2= 0.966; p<0.001). La longue durée du stade pachytène chez le rat explique la stabilité du pourcentage de spermatocytes au stade pachytène (R^2= 0.393; p=0.096).

En présence de cadmium, quelque soit la concentration utilisée, le profil de différenciation des cellules méiotiques reste inchangé pour 3 des 4 stades étudiés. Le pourcentage de spermatocytes au stade leptotène diminue significativement avec le temps (R^2= 0.776; p=0.004 pour le Cd 0.1µg/L, R^2= 0.805; p=0.006 pour le Cd 1µg/L et R^2= 0.619; p=0.021 pour le Cd 10µg/L). Le pourcentage de spermatocytes pachytène reste stable et le pourcentage de spermatocytes diplotène augmente significativement avec le temps dans les 3 conditions de cadmium (R^2= 0.955; p<0.001 pour le Cd 0.1µg/L, R^2= 0.797; p=0.003 pour le Cd 1µg/L et R^2= 0.856; p=0.001 pour le Cd 10µg/L). Les spermatocytes au stade zygotène ont une cinétique différente en présence de cadmium de celle observée dans les cultures témoins. Pour les concentrations de 0.1 et 1µg/L de cadmium, nous observons une décroissance significative linéaire (et non parabolique) de ces cellules de J5 à J25 (R^2= 0.874; p=0.001 et R^2= 0.609; p=0.022 respectivement). Cette tendance n'est pas retrouvée avec la plus forte concentration du toxique (R^2= 0.030; p=0.684).

		J5	J7	J10	J12	J14	J17	J22	J25
Control	Leptotene	14.9% ± 0.8	13.6% ± 2	9.6% ± 1.2	3.8% ± 1.7	5,5%± 2.2	1,8% ± 0,3	3%	0%
	Zygotene	21.9% ± 5.8	25.6% ± 7.6	23.9% ± 0.7	19.3% ± 0.4	16.3% ± 4.7	13.8% ± 3.9	10%	10%
	Pachytene	57.9% ± 4.3	52.9% ± 3.5	55.3% ± 3.9	60.5% ± 2	63.5% ± 6.5	62.9% ± 2	63%	60%
	Diplotene	5,2% ± 3	7.5% ± 2.8	11.2% ± 2.9	16.4% ± 0.8	18.7% ± 4.6	21.4% ± 3.9	24%	30%
Cd 0.1 µg/L	Leptotene	16.5% ± 6.4	10.5% ± 3.5	6,4% ± 2,6	3.6% ± 0.9	5.3% ± 2.8	3.1% ± 1.6	2%	0%
	Zygotene	23.4% ± 3.7	20.6% ± 6.5	17.4% ± 6.4	17.1% ± 4.2	12.4% ± 1.5	15.4% ± 5	9%	10%
	Pachytene	54.4% ± 2.6	57.3% ± 3.8	64.2% ± 4.9	63.2% ± 4.4	63.3% ± 5.9	64.5% ± 4.8	62%	60%
	Diplotene	6.6% ± 4	10.3% ± 4	13.7% ± 2.4	16.6% ± 1.9	18.6% ± 2	17% ± 3.6	27%	30%
Cd 1 µg/L	Leptotene	13.9% ± 2.6	12.1% ± 2	8.7% ± 0.6	5.3% ± 0.9	5.3% ± 2.5	4.9% ± 1	4%	10%
	Zygotene	20.5% ± 7.8	19.9% ± 9	24.4% ± 11	24.7% ± 13	15.3% ± 6.7	17,8% ± 8,6	14%	10%
	Pachytene	55.2% ± 5	60.7% ± 7.2	59.5% ± 7	56.9% ± 5.5	65% ± 3	64.3% ± 4.6	62%	40%
	Diplotene	6.6% ± 1.9	7.9% ± 4	8% ± 4.4	12.4% ± 6.2	15% ± 4.4	15.5% ± 4.9	20%	40%
Cd 10 µg/L	Leptotene	14.7% ± 2.5	9.5% ± 2.1	8.2% ± 1.1	5.6% ± 0.8	5.5% ± 0.5	3.6% ± 2.1	8%	0%
	Zygotene	22.8% ± 9	20% ± 9.2	18.4% ± 1.6	14.7% ± 1	12.3% ± 2.4	16.2% ± 3	20%	25%
	Pachytene	55.8% ± 5.9	56.4% ± 4	63.1% ± 3.4	61.9% ± 1.6	65% ± 6	65% ± 3.5	54%	55%
	Diplotene	6.7% ± 2.9	10.8% ± 4	10.2% ± 1.1	14.3% ± 5.2	17.2% ± 4.7	15.2% ± 1.6	18%	20%

Tableau A : Aspects quantitatifs de la prophase de première division méiotique chez le rat ex-vivo avec et sans présence de Cadmium.

c- Analyse qualitative des spermatocytes pachytène en présence de cadmium

Les résultats sont présentés dans le Tableau B.

Le pourcentage total de noyaux anormaux augmente significativement au cours du temps dans les cultures témoins (R^2= 0.720; p=0.016) et dans les cultures en présence de cadmium (R^2= 0.800; p=0.007 pour le Cd 0.1µg/L, R^2= 0.486; p=0.05 pour le Cd 1µg/L et R^2= 0.833; p=0.004 pour le Cd 10µg/L). Ce pourcentage de noyaux anormaux est significativement plus élevé en présence de cadmium que dans les cultures témoins à chaque jour de culture analysé (p<0.001). Jusqu'à J12, il augmente de manière dose dépendante avec les concentrations du toxique. A partir de J14, le pourcentage de spermatocytes anormaux n'est pas significativement différent entre des doses de 0.1µg/L et de 1µg/L de cadmium mais est significativement plus élevé avec la plus forte concentration de cadmium (10µg/L). Il est à noter qu'au dernier jour de culture avec 10µg/L de cadmium, la totalité des spermatocytes pachytène analysés sont anormaux.

L'anomalie la plus fréquente est *la fragmentation des complexes synaptonémaux* qui augmente significativement entre le début et la fin de la culture dans la culture témoin et aux 2 plus fortes concentrations de cadmium (R^2= 0.766; p=0.01 pour le témoin, R^2= 0.660; p=0.026 pour le Cd 1µg/L et R^2= 0.741; p=0.013 pour le Cd 10µg/L). L'augmentation au cours du temps n'est pas significative avec 0.1µg/L de cadmium. A chaque jour de culture, la fragmentation des CS est toujours significativement plus importante en présence de cadmium que dans les cultures témoins quelque soit la concentration du toxique. Les pourcentages de noyaux fragmentés sont significativement plus élevés avec 10µg/L de cadmium qu'avec les 2 autres concentrations du toxique.

Les *asynapsis* augmentent significativement de manière linéaire avec les jours dans les 4 conditions de culture (R^2= 0.645; p=0.03 pour le témoin, R^2= 0.693; p=0.02 pour le Cd

0.1µg/L ; R^2= 0.946; p<0.001 pour le Cd 1µg/L et R^2= 0.755; p=0.011 pour le Cd 10µg/L). Dès le début de la culture, les noyaux asynapsés sont significativement plus nombreux que dans les cultures témoins avec les 2 plus fortes concentrations de cadmium. Avec 0.1µg/L de cadmium, la différence ne devient significative qu'à partir de J14.

Le pourcentage de *noyaux avec des CS « en pointillé »* n'augmente pas ni avec le temps de culture, ni avec la dose de cadmium. Cette anomalie n'a pas pu être analysée dans les cultures avec 10µg/L de cadmium car les noyaux des spermatocytes étaient trop altérés.

Une nouvelle anomalie est apparue dans ces cultures en présence de cadmium. Il s'agit d'un *aspect anormal de la coloration des CS qui apparaissent « mités ».* Cet aspect de coloration non homogène est liée à la présence de très nombreuses petites lacunes non colorées par le fluorochrome (figure 19). Cette anomalie peut toucher quelques bivalents ou la totalités des bivalents d'un noyau. Elle est présente dans les cultures témoin à de faibles pourcentages et augmente significativement en présence de cadmium à chaque jour d'analyse (p< 0.001) de manière dose dépendante (% de noyaux mités avec Cd 10µg/L > % de noyaux mités avec Cd 0.1µg/L et 1µg/L p<0.05).

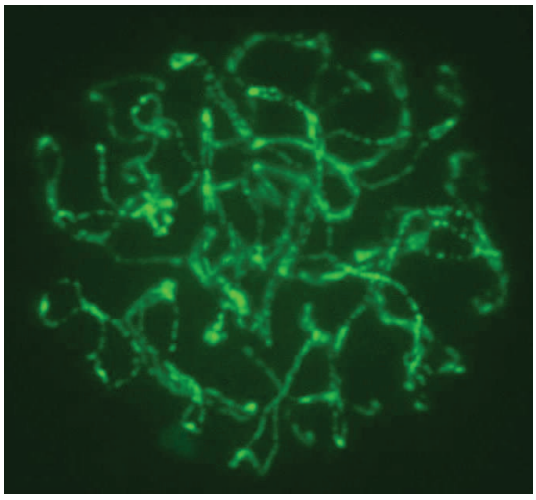


Figure 19: Spermatocyte au stade pachytène présentant à la fois un aspect «mité» des CS touchant l'ensemble des bivalents et des asynapsis

		J5	J7	J10	J12	J14	J17	J22	J25
control	% ny fragmentés	11.6% ± 1.9	8.2% ± 1.5	17.3%± 12.7	18.6%	16.8% ± 1.4	20.5% ± 3.5	22.2%	25%
	% ny asynapsés	8.5% ± 4	4.4% ± 1	11.9% ± 4.9	10.2%	8.4% ± 1.9	13.3% ± 5	15.9%	15.1%
	% ny pointillés	1.5% ± 2.1	2.5% ± 0.9	0.6% ± 0.8	0.8%	2.3% ± 1.7	1.9% ± 0.5	0%	1.2%
	% ny mités	1.6% ± 2.1	0%	2.2% ± 0.3	0.8%	0.9% ± 1.2	3.2% ± 0.1	7.9%	4.3%
	% total ny anormaux	14.6% ± 2.1	10.2% ±1.3	14.5% ± 6.3	22.8%	19.8% ± 0.9	27.6% ± 6.6	25.3%	16.2%
Cd 0.1 µg/L	% ny fragmentés	18.8% ± 2.2	19.6% ± 10	23.1% ± 9.4	30%	34.8% ± 3	28.9%± 10.7	24.2%	42.3%
	% ny asynapsés	10.3% ± 1.1	8.6% ± 2.7	12.1% ± 0.3	14.2%	27% ± 10.3	27,9% ± 9.4	24.2%	28.6%
	% ny pointillés	1.3% ± 1.9	2.2% ± 1.5	0%	1.6%	0.3% ± 0.4	2.6% ± 1.6	0%	0%
	% ny mités	3.6% ± 2.6	7.1% ± 0.6	5.8% ± 0.1	12.5%	4.6% ± 0.4	8.1% ± 2.4	9.6%	14.3%
	% total ny anormaux	24% ± 0.05	26.1%±10.2	31.7% ± 5.5	43.3%	40.8% ± 6.8	45% ± 17.4	45.2%	57%
Cd 1 µg/L	% ny fragmentés	19% ± 6.4	27.7% ± 0.4	37.7%± 14.7	43.4%	29.2% ± 4.3	37.4% ± 9.4	45.2%	63%
	% ny asynapsés	9.3% ± 1.9	18% ± 4.1	19.8% ± 5.9	26.4%	24.6% ± 0.6	30.6% ± 7.3	38.7%	45.4%
	% ny pointillés	1.3% ± 0.3	2.8% ± 0.6	3.2% ± 1.9	0%	0.7% ± 1.1	2% ± 1.3	3.2%	0%
	% ny mités	7.1% ± 1	12.7% ± 0.2	24.1% ± 4	31.1%	21.3% ± 7.8	29% ± 9.3	16.1%	43.6%
	% total ny anormaux	34.5% ± 9.5	38.6% ± 6.7	48.1% ± 6.7	50.9%	35.6% ± 6.6	48.4% ± 5.8	54.8%	73.2%
Cd 10 µg/L	% ny fragmentés	46.4%±12.9	48.2%±16.2	51.7%± 20.3	61.9%	52.2% ± 22	48.9%± 14.2	64.8%	72.7%
	% ny asynapsés	18.6% ± 1.4	36.3%±11.2	45.2%± 20.3	55.5%	58.9%±15.1	49.8% ± 1.4	61.1%	63.6%
	% ny pointillés				non évalué				
	% ny mités	25.2 %± 7.6	36.1% ± 6.1	51.1% ± 12	53.9%	51.9%±17.6	55.4% ± 12	48.2%	54.5%
	% total ny anormaux	59.9% ± 4.2	68.4%±11.9	72.5% ± 4.7	69.8%	73.1% ± 9.2	73.5% ± 6.5	81.5%	100%

Tableau B : Analyse qualitative des anomalies des complexes synaptonémaux durant le stade pachytène de la prophase de première division méiotique avec ou sans présence de cadmium.

4- Discussion

Dans cette troisième partie de la thèse nous confirmons que le modèle de culture de tubes séminifères de rat en chambre bicamérale représente un précieux outil de repro-toxicologie car il est utilisable avec de multiples substances potentiellement toxiques pour la fonction de reproduction. En effet, après sa validation et son utilisation avec le chrome hexavalent, nous obtenons ici des résultats très intéressants avec un autre métal lourd, le cadmium, qui est un polluant majeur de notre environnement. Au cadmium naturellement présent dans l'eau, l'air, ou les aliments que nous consommons, s'ajoute celui issu des activités industrielles humaines et surtout celui inhalé par tabagisme. Le cadmium a une toxicité connue depuis les années 50 et plus récemment, il a été reconnu responsable d'atteintes de la fonction de reproduction chez l'homme et chez l'animal. Le cadmium s'accumule dans l'organisme y compris au niveau des organes génitaux (Oldereid et coll. 1993) et peut provoquer une altération des paramètres spermatiques (Al Bader et coll. 1999, Benoff et coll. 2007), induire l'apoptose des cellules germinales (Benoff et coll. 2004), ou agir par effet cytotoxique (Turner et coll. 2003). Au niveau testiculaire, il a été montré que le cadmium pouvait provoquer des lésions vasculaires (Chia et coll. 1994), des dégénérescences cellulaires, une atrophie testiculaire et d'importantes lésions de la barrière hémo-testiculaire (Siu et coll. 2009). Cependant, les modèles expérimentaux utilisés lors de ces travaux sont souvent très loin de la réalité physiopathologique du testicule. Notre modèle de culture, en préservant les contacts étroits entre cellules germinales et cellules de Sertoli permet de tester le cadmium dans un système proche de ce qui se déroule in vivo avec des doses comparables à celles retrouvées dans les liquides biologiques d'hommes exposés (Elkin et coll. 2010, Pant et coll. 2003). Le cadmium, mis exclusivement dans le compartiment basal du système bicaméral, ne peut atteindre les cellules germinales qu'après avoir franchi la BHT reconstituée au contact de la membrane semi-perméable. De plus, les études méiotiques réalisées sur les

spermatocytes ainsi obtenus permettent, grâce aux techniques d'immunocytochimie avec l'AC anti-SCP3, une analyse très fine de la méiose, étape clé de la spermatogenèse. Grâce à l'analyse qualitative des noyaux des spermatocytes au stade pachytène de prophase I, nous progressons dans la compréhension des mécanismes d'action du toxique sur la spermatogenèse.

L'analyse quantitative fine en cytométrie de flux montre que le cadmium diminue de manière dose dépendante le nombre de cellules germinales obtenues en culture tandis que le nombre de cellules de Sertoli ne semble pas être influencé par ce toxique. Angenard et coll. (2010) ont aussi observé que le cadmium était responsable d'apoptose des cellules germinales mâles fœtales dans l'espèce humaine mais ce résultat n'a pas été confirmé dans la lignée de souris utilisée dans leur étude.

Dans notre travail, réalisé chez le rat, ce sont les spermatogonies et les spermatides rondes qui sont les plus affectées par la présence du toxique. La diminution du nombre de spermatogonies confirme l'hypothèse que le cadmium affecte les cellules germinales pendant la phase active de prolifération. Or la richesse en spermatogonies, via les mitoses goniales de cette phase, conditionne le nombre de spermatozoïdes potentiellement produits. Le cadmium pourrait ainsi provoquer une oligospermie comme le décrit Benoff et coll. en 2004.

Quant à la diminution du nombre de spermatides rondes, cellules les plus différenciées obtenues en culture, elle peut s'expliquer par la fragilité de ces cellules très vulnérables à l'action d'un toxique. Cependant, la sévérité des anomalies méiotiques observées en présence de cadmium lors de l'étude immunocytochimique peut être responsable de l'apoptose de ces cellules en fin de méiose et expliquer la raréfaction des spermatides rondes.

D'autre part, le cadmium pourrait avoir un effet sur la chronologie de la méiose. Bien que le profil de différenciation des cellules en culture reste inchangé pour les stades leptotène, pachytène et diplotène quelque soit la dose utilisée, le stade zygotène montre une cinétique perturbée en présence du toxique. L'évolution parabolique des spermatocytes au stade zygotène montrant un maximum à J7, observée précédemment (Geoffroy-Siraudin et coll. 2010) et dans les cultures témoins de la présente étude, n'est pas retrouvée en présence de cadmium. Aux faibles doses du toxique (0.1 et 1 µg/L), la proportion de cellules au stade zygotène décroît linéairement de J5 à J25 sans montrer de maximum. Cependant, cette tendance n'est pas mise en évidence avec la plus forte concentration du toxique et cette notion reste à vérifier sur de nouvelles cultures.

Enfin, l'analyse qualitative des spermatocytes au stade pachytène montre un impact important du cadmium sur les bivalents chromosomiques. Dans la culture témoin, nous retrouvons des pourcentages de noyaux anormaux concordants avec ceux établis dans les cultures précédentes (Geoffroy-Siraudin et coll. 2010). Chacune des anomalies augmente significativement avec le temps de culture mais reste à des taux relativement faibles.

Le cadmium augmente de manière dose dépendante le pourcentage total de noyaux anormaux y compris avec la dose la plus faible. Ces pourcentages ne sont pas significativement différents de ceux retrouvés en présence de Cr (VI). Au dernier jour de culture en présence de 10 µg/l de cadmium, tous les noyaux sont anormaux. Cependant, l'effet du cadmium sur la méiose est différent de celui obtenu avec le chrome hexavalent :

- l'anomalie prédominante en présence de cadmium est la fragmentation des CS alors qu'il s'agissait d'asynapsis avec le Cr(VI). Le mécanisme d'action du toxique semble différent
- de plus, nous mettons en évidence dans ce travail, une nouvelle anomalie jusque là non décrite : l'aspect « mité » des CS. Cette anomalie est aussi retrouvée dans la

culture témoin à de faibles taux. Nous n'avions pas noté la présence de ces CS mités lors de notre travail sur le chrome mais il est possible que notre attention sur cette anomalie ait été attirée ici par sa fréquence très élevée en présence du cadmium : plus de 50% des noyaux avec 10 µg/l de Cd. Cet aspect met en évidence une altération de la structure même du complexe synaptonémal.

Ces anomalies très importantes retrouvées au cours de la prophase I de méiose en présence du toxique montrent que le cadmium agit dès le début de la différenciation des cellules germinales.

Nous avons donc montré dans ce travail la toxicité du cadmium sur la spermatogenèse du rat même à des doses faibles de 0.1 µg/L. L'analyse en immunocytochimie permet d'identifier des lésions propres à ce métal, jusque là jamais décrite. De nouvelles cultures de 25 jours en présence de cadmium sont nécessaires afin de confirmer les observations que nous avons faites dans ce travail. Il est aussi maintenant indispensable de rechercher les effets de ce toxique sur le génome en développant des tests de génotoxicité (test des micronoyaux, recherche d'adduits de l'ADN) et d'étudier la modification de l'expression des gènes transcrits sous l'effet de ce métal par des études transcriptomiques et protéomiques.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Notre premier travail, évaluant l'évolution des paramètres du sperme dans le laboratoire de Biologie de la Reproduction de l'Hôpital de la Conception de Marseille, a montré **un déclin des principaux paramètres au cours des 20 ans de l'étude**. Ce déclin concerne la totalité des patients analysés mais aussi, à moindre échelle, le groupe sélectionné de spermogrammes ayant une numération totale normale (> 40M/ éjaculat).

Dans la population totale, nous observons une décroissance significative de 1.4% par an de la concentration en spermatozoïdes et de 1.5% par an de la numération totale des spermatozoïdes, les moyennes annuelles de ces deux paramètres restant toujours supérieures aux valeurs qualifiées de normales par l'OMS. Ces résultats viennent s'ajouter aux nombreuses études de la littérature qui montrent une chute de la numération dans les dernières décennies. De plus, le pourcentage annuel de spermogrammes présentant une azoospermie augmente significativement au cours de l'étude de 3.4% en 1988 à 4.5% en 2007. L'étude histopathologique des biopsies testiculaires réalisées entre 2001 et 2007 dans le cadre d'une prise en charge en ICSI, révèle que cette augmentation concerne préférentiellement les azoospermies de type non-obstructives. Bien que cette tendance ne soit pas significative au cours de cette période de 7 ans, elle suggère que l'augmentation de fréquence des azoospermies retrouvée dans cette étude pourrait être due à une atteinte croissante de la spermatogenèse.

Bien que la mobilité progressive totale ne diminue pas au cours de la durée de l'étude, nous avons tout de même observé un déclin important de la mobilité progressive rapide dans les deux populations étudiées (respectivement 5.6% et 5.3% par an). Cette tendance, confirmée dans six autres études de la littérature, peut avoir des répercussions sur la fertilité clinique des hommes car le pourcentage de spermatozoïdes progressifs rapides est le meilleur indicateur de la capacité fécondante d'un sperme.

Le pourcentage des formes typique montre lui aussi une décroissance significative avec le temps dans les deux populations (respectivement 1.9% et 1.5% par an). Ce travail est

le premier à étudier le détail des anomalies morphologiques des spermatozoïdes. Nous avons tenu compte pour l'interprétation des données, des modifications intervenues dans la classification de David, mises en application en 2003 dans notre laboratoire. L'analyse détaillée des anomalies cytologiques montre une atteinte polymorphe touchant les 3 régions du spermatozoïde : tête, cou et flagelle.

Pour l'ensemble de cette étude, nous avons écarté les différents biais de sélection pouvant interférer avec nos résultats : stabilité des techniques d'analyse et du personnel médical et paramédical, avènement de l'ICSI en 1995, modifications de la classification cytologique en 2003, ajustement des données à l'âge des patients. Concernant le nombre de spermogrammes par patient, nous avons montré qu'étant donné le court laps de temps entre le premier et le dernier spermogramme, il ne pouvait pas expliquer le déclin observé sur 20 ans.

Nous avons alors envisagé plusieurs hypothèses pouvant expliquer ce déclin des paramètres spermatiques et **nous avons suggéré que les facteurs environnementaux qui peuvent agir dès la vie fœtale, dans l'enfance, à la puberté ou à l'âge adulte, peuvent en partie être responsables de ces altérations. La surveillance des paramètres du sperme devient de nos jours une priorité de santé publique.**

Un aspect important de l'évaluation des risques pour la santé publique de substances toxiques présentes dans l'environnement est le développement de modèles toxicologiques ex-vivo permettant différentes approches des mécanismes potentiellement impliqués dans l'altération de la spermatogenèse. Dans ce but, nous avons validé le modèle expérimental de cultures de tubes séminifères de rat développé par le Dr Durand et collaborateurs (Institut de Génomique Fonctionelle de Lyon) pour l'étude ex-vivo de la méiose du rat. Nous avons appliqué à ce modèle la méthodologie que nous avions développée pour l'étude la méiose humaine en particulier la technique d'immunocytochimie avec un anticorps spécifique dirigé contre une protéine des complexes synaptonémaux (SCP3). Cette approche nous a permis

d'étudier en présence de deux toxiques, le Chrome (VI) et le Cadmium, la prophase de la première division méiotique et ainsi d'explorer les effets de ces deux toxiques sur le déroulement des deux étapes fondamentales de la méiose, appariement et recombinaison génétique, dont l'altération retentit sévèrement sur la poursuite de la spermatogenèse. Il est important de rappeler que les toxiques sont introduits dans le compartiment basal du système de culture et ne peuvent atteindre les cellules germinales qu'après avoir traversé la barrière hémo-testiculaire préservée dans ce modèle, mimant ce qui se déroule in vivo.

Nous avons tout d'abord analysé par cette technique la méiose normale in vivo chez le rat impubère, chez le rat de 42 jours (correspondant à l'âge atteint au dernier jour de culture) et chez le rat adulte. Nous avons comparé les résultats obtenus à ceux des cultures de tubes séminifères réalisées en l'absence de toxiques et nous avons montré qu'il existait une correspondance parfaite entre les résultats obtenus in vivo et ex-vivo. La cinétique de différenciation des cellules en culture a ensuite été établie grâce à l'utilisation du BrdU.

Nous avons alors débuté l'introduction des substances toxiques dans les cultures. Nos résultats ont été obtenus à partir des données de trois séries de cultures réalisées en l'absence ou en présence de concentrations croissantes de Chrome Hexavalent : 1, 10 et 100 μg/L. Les dosages réalisés par ICP-MS dans les suspensions cellulaires confirment que la concentration cellulaire de Chrome (VI) augmente avec les concentrations du toxique ajouté dans le milieu basal de la chambre bicamérale. L'analyse en immunocytochimie des spermatocytes au stade pachytène montre clairement l'impact du Chrome (VI) sur la méiose du rat. En effet, le pourcentage total de noyaux anormaux augmente régulièrement et significativement au cours de la culture de manière dose-dépendante . Les asynapsis et la fragmentation des CS sont les deux anomalies les plus fréquemment observées. Nos résultats confirment les données de la littérature qui montrent une atteinte testiculaire provoquée par ce métal mais surtout soulignent que des doses faibles de chrome, qui correspondent à celles retrouvées chez des

individus qui ne sont pas particulièrement exposés à ce métal, sont capables d'altérer la qualité de la spermatogenèse.

De la même façon, nous avons réalisé trois séries de cultures en l'absence ou en présence de Cadmium à des concentrations croissantes de 0.1, 1 et 10 µg/L. Nos résultats montrent une atteinte de la spermatogenèse en présence de ce métal plus sévère que celle observée en présence de Chrome (VI). En effet, le cadmium a un impact sur la richesse cellulaire et l'analyse détaillée en cytométrie de flux montre que cet impact est très différent selon le type cellulaire étudié. Les spermatogonies et les cellules les plus différenciées obtenues en culture, les spermatides rondes, sont les plus touchées alors que l'effet est moindre sur les cellules intermédiaires. Le nombre de cellules germinales diminue de manière dose-dépendante en présence du toxique. L'analyse qualitative des spermatocytes au stade pachytène montre une augmentation significative des noyaux anormaux par rapport aux cultures témoins et là encore, de manière dose–dépendante. A la plus forte concentration de cadmium et au dernier jour de culture, il n'y a plus aucun noyau morphologiquement normal. L'anomalie la plus fréquemment rencontrée est la fragmentation des CS qui augmente de façon significative aux deux plus fortes concentrations de cadmium. Les noyaux asynapsés sont eux aussi significativement plus nombreux avec les deux concentrations les plus fortes de cadmium que dans la culture témoin. Mais l'anomalie la plus caractéristique retrouvée dans les cultures faites en présence de ce métal est la présence de noyaux d'aspect « mité » dont le pourcentage augmente significativement à chaque jour d'analyse de manière dose-dépendante. Cette coloration non homogène est liée à la présence de très nombreuses petites lacunes non colorées par le fluorochrome traduisant l'atteinte de la structure même du CS. Cette anomalie peut toucher quelques bivalents ou la totalité des bivalents d'un noyau. Nous avons montré que le cadmium était une substance extrêmement toxique pour le testicule qui agit à faible concentration et dès le début de la différenciation des cellules germinales.

Notre travail a permis de montrer que **les métaux lourds sont toxiques pour la lignée germinale mâle et qu'il existe des degrés de sévérité en fonction de la nature et de la concentration du métal.** Dans la présente étude le cadmium altère sévèrement la spermatogenèse que le Chrome (VI). L'étude qualitative de la méiose montre qu'à une étape bien précise de la spermatogenèse les effets sont différents selon le métal utilisé. Ce travail souligne l'**intérêt des cultures ex-vivo de tubes séminifères comme nouvel outil de repro-toxicologie** et de la réalisation sur ces modèles des études immunocytochimiques de la méiose pour l'appréciation des mécanismes d'action des substances toxiques sur la spermatogenèse.

PERSPECTIVES

L'identification des substances toxiques pour la reproduction et leurs mécanismes d'action constitue un défi scientifique majeur pour les années à venir. Un aspect important de l'évaluation des risques pour la santé publique des substances toxiques présentes dans l'environnement est le développement de modèles toxicologiques ex-vivo utilisant des modèles de culture de cellules germinales. Le modèle de culture de tubes séminifères de rat développé par Durand et collaborateurs apparaît parfaitement adapté au développement de tests de toxicologie et peut ainsi être utilisé pour tester la génotoxicité de nombreux facteurs physiques ou chimiques sur les cellules somatiques et germinales du testicule. Les perspectives d'utilisation de ce modèle sont nombreuses en développant l'étude des mécanismes d'action des substances toxiques sur le déroulement de la spermatogenèse, sur les altérations du génome germinal et sur la carcinogenèse testiculaire.

Nous avons dans notre étude montré que ce modèle était parfaitement adapté à l'étude cytogénétique de la méiose après l'introduction de 2 métaux lourds dans le milieu de culture : le Chrome (VI) et le Cadmium. L'utilisation d'autres anticorps que celui utilisé dans ces premiers travaux, tels que des anticorps dirigés contre les protéines impliquées dans les phénomènes de recombinaison génétique, nous orientera avec plus de précision vers l'étape défectueuse.

Cette méthodologie peut être adaptée à d'autres substances toxiques : métaux lourds, substances organo-métalliques ou organiques, dans la mesure où elles sont solubles dans le milieu de culture. Parmi les nombreux produits susceptibles d'être responsables de pathologies testiculaires, nous allons étudier *le bisphénol A (BPA)* qui entre dans la composition du polycarbonate et constitue un des plus gros volume de produits chimiques manufacturés dans le monde (bouteilles, eaux minérales). Cette méthodologie permet aussi d'analyser plusieurs combinaisons de substances toxiques comme les micropolluants auxquels les populations sont exposées par l'eau et l'alimentation. Nous avons décidé de nous

intéresser à des substances correspondant aux grandes familles chimiques de pesticides appartenant ou ayant appartenu à l'annexe 1 de la directive européenne 91/414, c'est à dire des substances autorisées ou récemment retirées mais rémanentes : un organophosphoré, le dichlorvos, un thiocarbamate, *le carbofuran,* un benzimidazole, *le carbendazime* et un organophosphoré, *la vinchlozine*. Ces polluants seront analysés seuls ou en mélanges.

Ce modèle est aussi adapté à la réalisation des tests de génotoxicité. Perrin et coll. (2007) ont d'ores et déjà montré l'impact des radiations ionisantes sur les spermatocytes en culture grâce au **test des comètes** qui permet de détecter, quantifier et étudier l'évolution des cassures de brin de l'ADN dans les cellules germinales en différenciation. Nous adaptons actuellement le **test des micronoyaux** aux cellules germinales en culture. Ce test permet d'analyser le pouvoir aneugène et clastogène des toxiques au cours des phases de divisions des cellules germinales (mitoses spermatogoniales et méiose). Dans le but de rechercher d'éventuelles mutations de l'ADN liés à la présence d'adduits de l'ADN, nous allons détecter et quantifier ces **adduits** dans les cellules germinales cultivées en présence des toxiques cités plus haut et dans les spermatozoïdes des patients qui réalisent un spermogramme dans notre laboratoire. Pour les métaux lourds, nous allons utiliser une méthode par ICP-MS développée dans le laboratoire de Chimie Générale- Prévention des Risques et Nuisances Technologiques de la faculté de Pharmacie de Marseille avec lequel nous collaborons étroitement. Pour les substances organiques, nous avons le projet de développer la recherche des adduits de l'ADN en utilisant la méthode par LC-MS-MS, en collaboration avec le CEA (Commissariat à l'Energie Atomique) du site de Marcoule. Les adduits de l'ADN sont des outils indispensables non seulement dans la compréhension des mécanismes qui conduisent à des altérations de la spermatogenèse mais aussi dans le développement de biomarqueurs pour des substances spécifiques. Ils peuvent aussi être utilisés pour améliorer notre compréhension du mécanisme de carcinogenèse. Une conséquence de la présence d'adduits de l'ADN est la

transmission d'une mutation à la descendance pouvant intervenir dans la susceptibilité aux cancers des générations futures.

Parallèlement aux travaux réalisés dans notre équipe de recherche, nous collaborons pour l'extension aux autres méthodologies avec d'autres équipes impliquées : - dans l'étude de la fonctionnalité des jonctions GAP présentes entre les cellules de Sertoli et entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales ; - dans l'étude de la dérégulation de l'expression génique (transcriptome, développement de puces à ADN) sous l'influence de faibles concentrations de toxiques ; - dans l'analyse du peptidome de surnageants de cultures cellulaires et d'extraits cellulaires.

ANNEXES

ANNEXE 1: Liste des abréviations

ABP: Androgen Binding Protein

AC: Anticorps

ADN: Acide désoxyribonucléique

AMP: Assistance Médicale à la Procréation

AMPc :Adénosine monophosphate cyclique

ATP : Adénosine triphosphate

BHT: Barrière Hémo-Testiculaire

BrdU: Bromo-2'-Deoxyuridine

CDB: Cassure Double Brin

CMR: Cancérogènes, Mutagènes et Reprotoxiques

CO: Crossing-Over

CS:Complexe synaptonémal

ECHA: European Chemicals Agency

ERM: Ets related molecule

FSH: Hormone Folliculo-Stimulante

GNDF: Glial cell line Derived Neurotrophic Factor

GnRH: Gonadotrophine Releasing Hormone

HAM: Hormone Anti-Mullérienne

H2AX: Histone 2A, sous-famille X

ICSI: Intracytoplasmic Sperm Injection

IGF1: Insuline Growth Factor

INRS: Institut National de Recherche et de Sécurité

LH: Luteinizing Hormone

ME: Microscopie Electronique

MLH1: MutL Homolog 1

MPF: m-phase Promoting factor

MO: Microscopie Optique

MSH4: MutS Homolog 4

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBT: substance Persistantes, Bioaccumulables et Toxiques

vPvB : substance très Persistante et très Bioaccumulable

Plzf : Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger

PKA: Protéine Kinase A

PRL: Prolactine

PKP2: Proteine Plakophilin 2

PSSC: Premature Separation of Sister Chromatids

RAD51: RecA Drosophila 51

REACH: Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances

RLF: Relaxine Like Factor

REc8: Recombinant 8

SCC: Sister Chromatid Cohesion

SCP1: Synaptonemal Complex Protein 1

SCP2: Synaptonemal Complex Protein 2

SCP3: Synaptonemal Complex Protein 3

SCF: Stem Cell Factor

SGF: Seminiferous Growth factor

SMC: Structural Maintenance Protein

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

SSC: Spermatogonia Stem Cell

STAG3: Stromal Antigen 3

TNF: Tumor Necrosis Factor

TGF: Transforming Growth Factor

ANNEXE 2: Liste des Figures

Figure 1: Chronologie de la spermatogenèse chez le rat
Figure 2 : Acteurs clés impliqués dans le renouvellement et dans l'entrée en différenciation des SSCs
Figure 3 : Microscopie optique d'un fragment de tube séminifère de rat au stade IV-V et VIII
Figure 4: Diagramme des différents stades du cycle de l'épithélium séminifère chez le rat
Figure 5 : Relation d'une cellule de Sertoli avec diverses cellules germinales de l'épithélium séminifère du rat
Figure 6: Constituants protéiques des différents types de jonctions cellulaires dans l'épithélium séminifère
Figure 7 : Phénotype de souris males porteuses de délétions des protéines de jonctions transmembranaires cibles.
Figure 8 : Régulation endocrine de la spermatogenèse
Figure 9 : Rôles possibles des oestrogènes dans le tractus génital mâle
Figure 10: Schéma général de la méiose
Figure 11: Formation du Complexe Synaptonémal
Figure 12: Modèle schématique de l'organisation des protéines du complexe synaptonémal (SC), des cohésines et de la chromatine au stade pachytène.
Figure 13: Schéma de la recombinaison réciproque selon le modèle de la double jonction de Holiday
Figure 14 : Schéma récapitulatif du comportement des chromosomes au cours de la prophase de 1ère division méiotique
Figure 15: Puit de culture en chambre bicamérale
Figure 16: Aspects des différents stades de prophase I marqués par l'anticorps anti-SCP3
Figure 17: Anomalies qualitatives observées sur les spermatocytes au stade pachytène marqués par l'anticorps anti-SCP3
Figure 18: Analyse en cytométrie de flux du nombre de cellules de sertoli et de cellules germinales au cours de la culture de tubes séminifères de rat en l'absence ou en présence de cadmium.
Figure 19: Spermatocyte au stade pachytène présentan un aspect mité de ses CS avec l'anticorps anti-SCP3

Taleau A : Aspects quantitatifs de la prophase I chez le rat ex-vivo avec et sans présence de cadmium.

Tableau B : Analyse qualitative des anomalies des CS durant le stade pachytène avec ou sans présence de cadmium.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adamopoulos DA, Pappa A, Nicopoulou S, Andreou E, Karamertzansi M, Michopoulos J, Deligianni V, Simou M. (1996) Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the Greater Athens area during the period 1977-1993. Hum Reprod, 11:1936-1941.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biologie moléculaire de la cellule, 4ème édition. (2004) Flammarion Ed, Paris

Al-Bader A, Omu AE, Dashti H. (1999) Chronic cadmium toxicity to sperm of heavy cigarette smokers: immunomodulation by zinc. Arch Androl, 43:135-140.

Andersen AG, Jensen TK, Carlsen E, Jorgensen N, Andersson AM, Krarup T, Keiding N and Skakkebaek NE. (2000) High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. Hum Reprod, 15: 366-372

Angell RR. (1995) Meiosis I in human oocytes. Cytogenet Cell Genet, 69: 266-272.

Angell RR, Xian J, Keith J, Ledger W, Baird DT. (1994) First meiotic division abnormalities in human oocytes: mechanism of trisomy formation. Cytogenet Cell Genet, 65: 194-202.

Angenard G,Muczynski V,Coffigny H,Pairault C,Duquenne C,Frydman R,Habert R,Rouiller-Fabre V,Livera G. (2010) Cadmium increases human fetal germ cell apoptosis. Environmental Health Perspectives, 118: 331-337.

Aquila S, Sicsi D, Gentile M, Middea E, Catalano S, Carpino A et al. Estrogen receptor ERα and ERβ are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence for their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH Kinase/Akt pathway. J Clin Endocrinol Metab, 89: 1443-1451.

Aruldhas M, Subramanian S, Sekar P, Vengatesh G, Chandrahasan G, Govindarajulu P and Akbarsha MA. (2005) Chronic chromium exposure-induced changes in testicular histoarchitecture are associated with oxidative stress: study in a non-human primate (Macaca radiata Geoffroy). Human reproduction, 20: 2801-2813

Aschim EL, Saether T, Wiger R, Grotmol T, Haugen TB. (2004) Differential distribution of splice variants of estrogen recptor beta in human testicular cells suggests specific functions in spermatogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol, 92: 97-106.

ATDSR. (2007) The 2007 CERCLA Priority List of Hazardous Substances. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Departement of Health and Human Services, Atlanta, GA.

ATDSR. (2008) Cadmium toxicity- Case studies in environmental medicine. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Departement of Health and Human Services, Atlanta, GA.

Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. (1995) Decline in semen quality among fertile men in paris during the past 20 years. New England Journal of medicine, 332: 281-285.

Auger J, Eustache F. (2000) Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. Andrologie, 120: 358-373.

Baudat F, Keeney S. (2001) Meiotic recombination: making and breaking go hand in hand. Curr Biol ,11:R45–R48.

Barceloux DG. (1999) Chromium. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 37, 173–194.

Barlow AL, Hultén MA. (1998) Crossing over analysis at pachytene in man. Eur J Hum Genet,6:350-358.

Benoff S, Hurley IR, Barcia M, Mandel FS, Cooper GW. (1997) A potential role for cadmium in the etiology of varicocele associated infertility. Fertil Steril, 67: 336-347.

Benoff S, Millan C, Hurley IR, Barbara N et Marmar JL. (2004) Bilateral increased apoptosis and bilateral accumulation of cadmium in infertile men with left varicocele. Hum Reprod, 19: 616-627.

Benoff S, Chu CC, Marmar JL, Soko lRZ, Goodwin LO, Hurley IR. (2007) Volt-age-dependent calcium channels in mammalian spermatozoa revisited. Front Biosci, 7: 1420-1454.

Benoff S, Auborn K, Marmar JL et Hurley IR. (2008) Link between low-dose environmentally relevant cadmium exposures and asthenozoospermia in a rat model. Fertil Steril,89: 73-79.

Berliner AF, Jones-Witters P. (1975) Early effects of a lethal cadmium dose on gerbil testis. Biol Reprod, 13: 240-247.

Berling S and Wölner-Hanssen P. (1997) No evidence of deteriorating semen quality among men in infertile relationships during the last decade: a study of males from Southern Sweden. Hum reprod, 12: 1002-1005.

Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. (2004) Cytokines and steroidogenesis. Mol Cell Endocrinol, 215: 135-141.

Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Mieusset R. (1996) Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse between 1977 and 1992. BMJ, 312: 471-472.

Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Turner JM. (2007) The management of DNA double-strand breaks in mitotic G2, and in mammalian meiosis viewed from a mitotic G2 perspective. Bioessays, 29:974-986.

Byers S, Pelletier RM. (1992). Sertoli-sertoli cell tight junctions and the blood testis barrier. IN: Cereijido M, editor. Tight junctions. Boca Raton, Florida : CRC press pp.279-304.

Byers S, Pelletier RM, Suarez-Quain C. (1993) Sertoli cell junctions and the seminiferous epithelium barrier. In : Russel LD, Griswold MD, editors. The Sertoli cell. Clear Water, FL: Cache River Press. Pp. 431-446

Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E. (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. BMJ, 12: 609-613.

Carreau S, Genissel C, Bilinska B, Levallet J. (1999) The oestrogen sources in the testis and the reproductive tract of the male. Inter J Androl, 22: 211-223.

Carreau S, said L, Lmabard S, Saad A, Galeraud-Denids I. (2007) RNA dynamics of fertile and infertile spermatozoa. Bioche Soc Trans, 35: 634-636.

Carreau S, Silandre D, Bois C, Bouraima H, Galeraud-Denis I, Delalande C. (2007) Estrogens : a new player in spermatogenesis. Folia Histochemica et Cytobiologica, 45: 5-10.

Chauvigné F, Menuet A, Lesné L, Chagnon MC, Chevrier C, Regnier JF, Angerer J, Jégou B. (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: 515-521.

Cheng CY, Mruk DD (2002). Cell junctions dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. Physiol Rev, 82: 825-874

Chia SE, Ong CN, Lee ST, Tsakok FH.(1992) Blood concentrationof lead, cadmium, mercure, zinc and cooper and human semen parameters. Arch Androl, 29: 177-183.

Chia SE, Xu B, Ong CN, Tsakok FH. (1994) Effect of cadmium and cigarette smoking on human semen quality. Int J Fertil Menopausol Stud, 39: 292-298.

Chiquoine AD. (1964) Observations on the early events of cadmium necrosis of the testis. Anat Rec, 149: 23-35.

Chung NP, Cheng CY.(2001) Is cadmium chloride-induced inter- Sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable in vitro model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? Endocrinology, 142: 1878–1888.

Clermont, Y., and Perey, B. (1957) Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. Am. J. Anat,100: 241–267.

Clermont Y, Leblond CP and Messier B. (1959) Durée du cycle de l'épithélium seminal du rat. Arch Anat. Microscop. Morphol. Exptl, 48: 37-56.

Clermont y, Harvey SC. (1965) Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-homone treated alibino rats. Endocrinology, 76: 80-89.

Clermont Y, Bustos-Obregon E. (1966) RE-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted « in toto ». Am.J;Anat, 122: 237-48.

Clermont Y. (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals; seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol Rev, 52:198-236

Clermont Y, Hermo L. (1975) Spermatogonial stem cells in the albino rat. Am.J;Anat, 142: 159-76

Clermont Y. (1993). Introduction to the Sertoli cell. In: Russel LD,Griswold MD, editors. The Sertoli cell. Clear Water; FL: Cache River Press. Pp. XXI-XXV.

Cooke VG, Naik MU, Naik UP. (2006) Fibroblast growth factor-2 filed to induce angiogenesis in junctionnal adhesion molecule-A-deficient mice. Arterioscer Thromb Vasc Biol, 26: 2005-2011.

Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre H, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update, 16: 231-245.

Costello MF, Sjoblom P, Haddad Y, Steigrad SJ, Bosch EG. (2002) No decline in semen quality among potential sperm donors in Sydney, Australia, between 1983 and 2001. J Assist Reprod Genet, 19: 284-290.

Dadoune JP. (2007) New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial spem cell niche. Folia Histochemica et Cytobiologica, 45: 141-147.

Danadevi K, Rozati R, Reddy PP, Grover P. (2003) Semen quality of Indian welders occupationally exposed to nickel and chromium. Reproductive Toxicology, 17: 451-456.

Danielsson BRG, Dencker L, Lindgren A, Tjalve H. (1984) Accumulation of toxic metals in male reproductive organs. Arch Toxicol, 7: 177-180.

David G, Bisson JP, Czyglik F, Jouannet P, Gernigon C. (1975) Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. Propositions pour un système de classification. J Gynecol Obstet Biol Reprod, 4: 17-36.

Delbes G, Levacher C, Duquenne C, Habert R. (2005) Le testicule foetal est-il en danger ? Med Sci (Paris), 21: 1083-1088.

Delfino FJ, Boustead JN, Fix C, Walker WH. (2003) NF-κB and TNF-α stimulate androgen receptor expression in Sertoli cells. Mol Cell Endocrinol, 201: 1-12

De Rooij DG. (1998) Stem cells in the testis. Int J Exp Pathol, 79: 67–80.

De Rooij DG. (2001) Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. Reproduction, 121: 347–354.

De Rooij DG, Grootegoed JA. (1998) Spermatogonial stem cells. Curr Opin Cell Biol, 10: 694–701.

De Rooij DG, Russell LD. (2000) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. J Androl, 21: 776–798.

Dym M, Clermont Y. (1970) Role of spermatogonia in the repair of seminiferous epithelium following X-irradiation of the rat testis. Am. J. Anat, 128: 265-282

Elbetieha A et Al-Hamood M. (1997) Long-term exposure of male and female mice to trivalent and hexavalent chromium compounds: effect on fertility. Toxicology, 116: 39-47.

Elinder CG, Kjellstrom T, Lind B, LInnman L, Piscator M, Sundstedt K (1983). Cadmium exposure from smoking cigarettes: variations with time and country where purchased. Environ Res, 32: 220-227.

Elkin LD, Piner JA, Sharpe RM. (2010) Toxicant-induced leakage of germ cell-specific proteins from seminiferous tubules in the rat: relationship to blood-testis barrier integrity and prospects for biomonitoring. Toxicol Sci, 12, epub ahead of print.

Emanuel E, Gobuloff E, Fisch H. (1998) MacLeod revisited: sperm counts distributions in 374 fertile men from 1971 to 1994. Urology, 51: 86-88.

Ernst and Bonde JP. (1992) Sex hormones and epididymal sperm parameters in rats following sub-chronic treatment with hexavalent chromium. Human Experimental Toxicology, 11: 255-258

Feki NC, Abid N, Rebai A, Sellami A, Ayed BB, Guermazi M, Bahloul A, Rebai T, Ammar LK. (2009) Semen quality decline among men in infertile relationships: experience over 12 years in the south of Tunisia. J Androl, 30: 541-547.

Fijak M and Meinhardt. (2006) The testis in immune privilege. Immunological reviews,213: 66-81.

Fish H, Goluboff E, Olson J, Felshuh J, Broder S, Barad D. (1996) Semen analyses in 1283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. Fert Ster, 65: 1009-1013

Geoffroy-Siraudin, C., Aknin-Seiffer, I., Metzler-Guillemain, C., Ghalamoun-Slaimi, R., Bonzi, M. F., Levy, R., and Guichaoua, M. R. (2007) Meiotic abnormalities in patients bearing complete AZFc deletion of Y chromosome. Hum. Reprod. 22: 1567–1572.

Geoffroy-Siraudin C, Perrard MH, Chaspoul F, Lanteaume A, Gallice P, Durand Ph, Guichaoua MR. (2010) Validation of a rat seminiferous tubule culture model as a powerful system for studying toxicant impact on meiosis: effect of hexavalent chromium. Tox Sci, 116: 286-96

Gilleron J, Carette D, Durand P, Pointis G, Segretain D. (2009) Connexin 43 a potential regulator of cell proliferation and apoptosis within the seminiferous tubule. Int J Biochem ecll boil, 41: 1381-1390

Giwercman A, Carlsen E, Keiding N, Skakkebaek NE. (1993) Evidence for increasing incidence of abnormalities of the human testis: a review. Environ health perspect, 101:65-71.

Gliki G, Ebnet K, Aurrand-Lions M, Imhof BA, Adams RH. (2004) Spermatid differenciation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctionnal adhesion molecule-C. Nature, 431: 320-324.

Godet, M., Damestoy, A., Mouradian, S., Rudkin, B., Durand, P. (2004) Key role for cyclin dependant kinases in the first and the second meiotic divisions of rat spermatocytes. Biology of Reproduction, 70: 1147-1152.

Godet M, Sabido O, Gilleron J and Durand Ph. (2008) Meiotic progression of rat spermatocytes requires mitogen-activated protein kinases of Sertoli cells and close contact between the germe cells and the Sertoli cells. Dev Biol, 315: 173-188

Goering PL, Waalkes MP, Klassen CD. (1995) Toxicology of cadmium, in Toxicology of metals Berlin Springer-Verlag Eds, 115: 189-214.

Goyer RA, Liu J, Waalkes MP. (2004) Cadmium and cancer of prostate and testis. Biometals, 17: 555-558.

Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA. (1999) CNS myelin and Sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. Cell, 99: 649-659.

Griswold MD. (1993) Protein secretion by Sertoli cells: general considerations In: Russel LD,Griswold MD, editors. The Sertoli cell. Clear Water; FL: Cache River Press.pp 195-200

Guichaoua MR, Perrin J, Metzler-Guillemain C, Saïas-Magnan J, Grillo JM. (2003) Reprod Humaine et Hormones, volume XVI, n°6, pp. 379 à 387

Guichaoua MR, Perrin J, Metzler-Guillemain C, Saias-Magnan J, Giorgi R and Grillo JM. (2005) Meiotic anomalies in infertile men with severe spermatogenic defects. Human Reproduction, 20: 1897-1902.

Harbison R.(1998) Cadmium. Hamilton and Hardy's in-industrial toxicology, 5th ed, St.Louis: 47-50

Harris AL. (2007) Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. Prog Biophys Mol Biol, 94: 120-143.

Hartung T, Rovida C. (2009) Chemical regulators have overreached. Nature, 27: 1080-1081.

Hassold T, Sherman S, Hunt P. (2000) Counting cross-overs: characterizing meiotic recombination in mammals. Hum Molec Genet 9: 2409–2419.

Hermo L, Pelletier RM, Cyr D, Smith C. (2010) Surfing the wawe, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. Microsc Res and techn, 73: 243-278

Hue D, Staub C, Perrard-Sapori MH, Weiss M, Nicolle JC, Vigier M, Durand P.(1998) Meiotic differentiation of germinal cells in threeweek cultures of whole cell population from rat seminiferous tubules. Biol Reprod, 59: 379-387.

Huckins C. (1971a) The spermatogonial stem cell population in adult rats. III. Evidence for a long-cycling population. Cell Tissue Kinet, 4: 335–349.

Huckins C. (1971b) The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. Anat Rec, 169: 533–557.

Huckins C. (1971c) The spermatogonial stem cell population in adult rats. II. A radioautographic analysis of their cell cycle properties. Cell Tissue Kinet, 4: 313–334.

Huckins S. (1978) Behavior ot stem cell spermatogonia in the adult rat irradiated testis. Biol. Reprod, 19: 747-60.

Hultén M, Eliasson R, Tillinger KG. (1970) Low chiasma count and other meiotic irregularities in two infertile 46, XY men with spermatogenic arrest. Hereditas, 65:285-290.

INRS, ND 2168-168-02. Cahier de note documentaire. Hygiène et sécurité au travail. N°187, 2ème trimestre 2002

Ilse-Dore Adler (1996) Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. Mutation research 352, 169-172.

Irvine, S., Cawood, E., Richardson, D., Macdonald, E., Aitken, J. (1996). Evidence of deterioring semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. BMJ, 312: 467-471.

Itoh N, Kayama F, Tatsuki J, Tsukamoto T. (2001) Have sperm counts deteriorated over the past 20 years in healthy young Japanese men? Results from the Sapporo Area. J of Androl, 22: 40-44.

Jarup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vather M. (1998) Health effects of cadmium exposure- a review of the literature and a risk estimate. Scand J Work Environ Health, 24: 1-51.

Jegou B. (1992) The sertoli cell in vivo and in vitro. Cell boil Toxicol, 8: 49-54.

Jensen T.K, Sobotka T, Hansen M, Tonnes Pedersen A, Lutz W, Skakkebaek N. (2008) Declining trends in conception rates in recent birth cohorts of native Danish women: a possible role of deteriorating male reproductive health. Int Journ of Androl, 31: 81-92.

Jorgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine S, Suominen J, Petersen J, Andersen AN, Auger J, Cawood EH, Horte A, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Vierula M, Toppari J,

Skakkebaek NE. (2001) Regional differences in semen quality in Europe. Hum Reprod, 16: 1012-1019.

Judis LA, R.Chan E, Schwartz S, Steftel A, and Hassold T. (2004) Meiosis I arrest and azoospermia in an infertile male explained by failure of formation of a component of the synaptonémal complex. Fertility and Sterility, 81: 205-209.

Kawanishi, S., Inoue, S., and Sano, S. (1986) Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate in the presence of hydrogen peroxide. J. Biol.Chem, 261: 5952–5958.

Kopera I, Bilinska B, Cheng CY and Mruk D. (2010) Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. Phil Trans R Soc B, 365: 1593-1605.

Kotsonis FN, Klaassen CD. (1977) Toxicity and distribution of cadmium administered to rats at sublethal doses. Toxicol Applied Pharmacol, 41: 667-680.

Lackner, J., Schatzl, G., Waldhor, T., Resh, K., Kratzik, C. and Marberger, M. (2005) Constant decline in sperm concentration in infertile males in a urban population: experience over 18 years. Fertil. Steril, 84: 1657-1661.

Lambrot R, Livera G, Coffigny H, Pairault C, Frydman R, Habert R, Rouiller-Fabre V. (2006) A new method for toxicity assays on human and mouse fetal testis. Biochimie, 88: 1831-1835.

Lambrot R, Muczynski V, Lécureuil C, Angenard G, Coffigny H, Pairault C, Moison D, Frydman R, Habert R, Rouiller-Fabre V. (2009) Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. Environ Health Perspect, 117: 32-37.

Lawrie NM, Tease C, Hulten MA. (1995) Chiasma frequency, distribution and interference maps of mouse autosomes. Chromosoma, 104: 308-314.

Leblond CP, Clermont Y. (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Ann N.Y. Acad Sci., 55: 548-573.

Li MWM, Mruk DD, Lee WM and Cheng CY. (2009) Cytokines and the junction restructuring events in the testis: an emerging new concept of regulation. Cytokine Growth Factor Rev, 20: 329-338.

Li MWM, Xia W, Mruk DD, Wang CQF, Yan HHN, Siu MKY et al. (2006) Tumor necrosis factor α reversibly disrupts the blood-testis barrier intergrity and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. J Endocrinol, 190: 313-329.

Li H, Chen Q, Li S, Yao W, Li L, Shi X, Wang L, Castranova V, Vallyathan V, Ernst E and Chen C. (2001) Effect of Cr(VI) exposure on sperm quality: human and animal studies. Ann occup Hyg, 45: 505-511.

Li J, Xu P, He Z. (1998) Effect of zinc deficiency on apoptosis of spermatogenic cells of rat testis. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 78: 91–93.

Lipshultz L. (1996) «The debate continues»-the continuing debate over the possible decline in semen quality. Fert Ster, 65: 909-911.

Luconi M, Forti G, Baldi E. (2006) Pathophysiology of sperm motility. Front Biosci,11: 1433-1447.

Lui WY and Cheng CY. (2007) Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis – a molecular and biochemical perspective. Cytokine Growth Factor Rev, 18: 299-311.

Lymberopoulos AG, Kotsaki-kovatsi VP, Taylor. A, Papaioannou. N and Brikas P.(2000) Effects of cadmium chloride admistration on the macroscopic characteristics of ejaculates from Chios ram-lambs. Theriogenelogie, 15: 1145-1157.

Marmar JL, Benoff S. (2005) The safety of ultrasonically guided testis aspiration biopsies and efficacy of use to predict varicocelectomy outcome. Human Reprod, 20: 2279-2288.

Marimuthu P, Kapilashrami MC, Misro MM, Singh G. (2003) Evaluation of trend in semen analysis for 11 years in subjects attending a fertility clinic in India. Asian J Androl, 5 : 221-225.

Mariotti A, Di Carlo L, Orlando G, Corradini ML, Di Donato L, Pompa P, Iezzi R, Cotroneo AR, Romani GL, Merla A. (2010) Scrotal thermoregulatory model and assessment of the impairment of scotal temperature control in varicocele. Annals of Biomedical Engineering, 26. Epub ahead of print.

Mason KE, Brown JA, Young JO, Nesbit RR. (1964) Cadmium-induced injury of the rat testis. Anat Rec, 149: 135-148.

Mauvais-Jarvis p.1984. Médecine de la reproduction masculine. Ed G Schaison-P Bouchard J Mahoudeau-F Labrie. Flammarion Med/sci press, univ Montréal

McLachlan JA. (2001). Environmental signalling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. Endocr rev, 22: 319-341.

Meistrich ML, van Beek MEAB. (1993) Spermatogonial stem cells: Assessing their survival and ability to produce differentiated cells. In: Chapin RE, Heindel J, editors. Methods in toxicology. New York: Academic Press. pp.106–123.

Mese G, Richard G, White TW. (2007) Gap junctions: basic structure and function. J Invest Dermatol, 127: 2516-2524.

Metzler-Guillemain C and Guichaoua MR. (2000) A simple and reliable method for meiotic studies in testicular samples used for intracytoplasmic sperm injection. Fertility and Sterility, 74: 916-919.

Mezard C, Bauda F, debrauwere H, de Massy B, Smith K, Soustelle C, Varoutas PL, Vedel M and Nicolas A. (1999) Mécanismes et contrôle de la recombinaison méiotique chez la levure Saccharomyces cerevisiae. Journal de la Société de Biologie, 193 : 23-27.

Mieusset R and Bujan L. (1995) Testicular heating and its possible contributions to male infertility. Int. J. Androl, 18: 169-184.

Mruk DD and Cheng CY. (2004) Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germe cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. Endocr Rev, 25: 747-806.

Mukhopadhyay D, Varghese A, Pal M, Banerjee S, Bhattacharyya A, Sharma S, Agarwal A. (2009) Semen quality and age-specific changes: a study between two decades on 3729 male partners of couples with normal sperm count and attending an andrology laboratory for infertility-related problems in an Indian city. Fert Ster, 93: 2247-2254.

Muntau H and Baudo R. (1992) Sources of cadmium, its distribution and turn-over in the freshwater environment. IARC, 118: 133-148.

Nanti M, Slone D, Jick H, Shapiro S, Lewis GP. (1969) Cadmium contents of cigarettes. Lancet, 2: 1329-1330.

Nasreddine L and Parent-Massin D. (2002. Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry? Toxicol Letter, 127: 29-41.

Oldereid NB, Thomassen Y, Attramadal A. (1993) Concentration of lead, cadmium and zinc in the tissue of reproductive organs of men. J Reprod.Fertil, 99: 421- 425.

Oliver-Bonet M, Turek PJ, Sun F, Ko E, Martin RH. (2005) Temporal progression of recombination in human males. Mol Hum Reprod, 11: 517-522.

Olsen GW, Bodner KM, Ramlow JM, Ross CE, Lipshultz LI. (1995) Have sperm counts been reduced 50 percent in 50 years? A statistical model revisited. Fertil Steril, 65: 450-453.

Ozaki-Kuroda K, Nakanishi H, Ohta H, Tanaka H, Kurihara H, Mueller S, Irie K, Ikeda W, Sakai T, Wimmer E, Nishimune Y, Takai Y. (2002) Nectin couples cell-cell adhesion and the actin scaffold at heterotypic testicular junctions. Curr Biol, 12: 1145-1150.

Pant N, Upadhyay G, Pandey S, Mathur N, Saxena DK, Srivastava SP. (2003) Lead and cadmium concentration in the seminal plasma of men in the general population: correlation with sperm quality. Reprod Toxicology, 17: 447-450.

Parizek J. (1960) Sterilization of the male by cadmium salts. J Reprod Fertil, 1: 294-309.

Paulsen CA, Berman NG, Wang C. (1996) Data from men in greater Seattle area reveals no downward trend in semen quality is not geographically uniform. Fert Ster, 65: 1015-1020.

Pereira ML, Santos TM, Pires das Neves R, Costa FG, Pedrosa de Jesus J. (2002) Cr(V) involvement in the toxicity pathway of testicular damage. Asian J Androl,4: 153-155

Pereira ML, Santos TM, Garcia e Costa and Pedrosa de Jesus J. (2004) Functional changes of mice sertoli cells induced by Cr(V). cell Biology and Toxicology, 20: 285-291.

Perrard, M.H., Hue, D., Staub, C., Le Vern, Y., Kerboeuf, D. and Durand, P. (2003) Development of the meiotic step in testes of pubertal rats: comparison between the in vivo situation and under ex vivo conditions. Mol. Reprod. Dev, 65: 86-95.

Perrard MH, Prisant N, Geoffroy-Siraudin C, Segretain D, Pointis G, Guichaoua MR, Durand P. (2009) Analysis of the intratesticular control of spermatogenesis by ex-vivo approaching. Folia Histol Cytobiol, 47: 1-6.

Perrin J, Lussato D, De Meo M, Durand P, Grillo JM, Guichaoua MR, Botta A, Bergé-Lefranc JL (2007).Evolution of DNA strand-breaks in cultured spermatocytes: the comet assay reveals differences in normal and irradiated germ-cells. Toxicol ex vivo, 21: 81-89.

Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K (2003). Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. Cell, 21:423-440.

Pineau C, Dupaix A, Jegou B. (1999) The coculture of Sertoli cells and germ cells: applications in toxicology. Toxicol In Vitro, 13: 513-520.

Pointis G, Fiorini C, Defamie N, Segretain D. (2005) Gap junctionnal communication in the male reproductive system. Bioch Biophys Acta, 1719: 102-116.

Pointis G, Gilleron J, Carette D, Segretain D. (2010) Physiological and physiolopathological aspects of connexins and communicating ngap junctions in spermatogenesis. Phil Trans R Soc B, 365: 1607-1620.

Prieto I, Tease C, Pezzi N, Buesa JM, Ortega S, Kremer L, Martínez A, Martínez-A C, Hultén MA, Barbero JL. (2004) Cohesin component dynamics during meiotic prophase I in mammalian oocytes. Chromosome Res, 12: 197-213.

Rasmussen PE, Erb K, Westergaard LG, Laursen SB. (1997) No evidence for decreasing semen quality in four birth cohorts of 1055 Danish men born between 1950 and 1970. Fert Ster, 68, 1059-1064.

Richardson C, Horikoshi N, Pandita TK. (2004) The role of the DNA double-strand break response network in meiosis. DNA Repair (Amst),3:1149-1164.

Romeo C and Santoro G. (2009) Varicocele and oinfertility: why a prevention? J Endocrinol Invest, 32: 559-561.

Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. (2000) Complex phenotype of mice lacking occluding, a component a tight junction strands. Mol Biol Cell, 11: 4131-42.

Sakaguchi T, Nishimoto M, Miyagi S, Iwama A, Morita Y, Iwamori N, Nakauchi H, Kiyonari H, Muramatsu M, Okuda A. (2006) Putative “stemness” gene JAM-B is not required for maintenance of stem cell state in embryonic, neural, or hematopoietic stem cells. Mol Cell Biol, 26: 6557-6570

Sarkar O, Mathur PP, Cheng CY, Mruk DD. (2008) Interleukin 1 alpha is a novel regulator of the blood testis barriere in the rat. Biol Reprod, 78: 445-454.

Satarug S and Moore MR. (2004) Adverse health effects of chronic exposure to low level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. Environ Health Perspect, 112: 1099-1103.

Sawasakia N, Iwasea S, Manoa T. (2001) Effect ok skin sympathetic response to local or systemic cold exposure on thermoregulatory functions in humans. Auton Neurosci, 87: 274-281.

Seo JT, Rha K, Park YS, Lee MS. (2000) Semen quality over a 10 year period in 22249 men in Korea. Int J of Androl, 23, 194-198.

Setchell BP. (1978) The mammalian testis. Elek Books, London and Cornell University Press, New york, 450p

Setchell BP. (2008) Blood-testis barrier, junctionnal and transport proteins and spermatogenesis. Adv Exp Med boil, 636: 212-233.

Sharpe RM and Skakkebaek NE. (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? Lancet, 341: 1392-1395.

Sherthan H and Schonborn I. (2001) Asynchronous chromosome pairing in male meiosis of the rat (Rattus norvegicus). Chromosome research, 9: 273-282.

Shine R, Peek J, Birdsall M. (2008) Declining sperm quality in new Zealand over 20 years. N Z Med J, 121: 50-56.

Siu ER, Mruk DD, Porto CS, Cheng CY. (2009) Cadmium-induced injury. Toxicology and applied pharmacology, 238: 240-249.

Skakkebaek NE, Jørgensen N, Main KM, Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Andersson AM, Juul A, Carlsen E, Mortensen GK, Jensen TK, Toppari J. (2006) Is human fecundity declining? Int J Androl, 29: 2-11.

Spirada S, Fonseca S, Lee A, Harrild K, Giannaris D, Mathers E and Bhattacharya S. (2007) Trends in semen parameters in the northeast of Scotland. J of Andrology, 28: 313-319

Sridharan S, Simon L, Meling DD, Cyr DG, Gutstein DE, Fishman GI, Guillou F, Cooke PS. (2007) Proliferation of adult Sertoli cells following conditional knockout of the gap junctionnal protein GJA1 (connexion 43). Biol Reprod, 76: 804-812.

Staub, C., Hue, D., Nicolle, C., Perrard-Sapori, M.H., Segretain, D. and Durand, P. (2000). The whole meiotic process can occur ex vivo in untransformed rat spermatogenic cells. Exp. Cell. Res, 260: 85-95

Sun F, Oliver-Bonet M, Turek PJ, Ko E and Martin RH. (2005) Meiotic studies in an azoospermic human translocation (Y;1) carrier. Molecular Human Reproduction, 11: 361-364

Sung P, Robberson DL. (1995) DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. Cell,11: 453-461.

Suominen J, Vierula M. (1993) Semen quality of Finnish men.BMJ, 306: 1579.

Swan SH, Elkin EP, Fenster L. (1997) Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. Environ Health Perspect, 105: 1228-1232.

Tam PP and Liu WK. (1985) Gonadal development and fertility of mice treated prenatally with cadmium during the early organogenesis stages. Teratology, 32: 453–462.

Tassistro, V., Ghalamoun-Slaimi, R., Sais-Magnan, J., and Guichaoua, M. R. (2009) Chronology of meiosis and synaptonemal complex abnormalities in normal and abnormal spermatogenesis, a new index in the evaluation of spermatogenesis quality. Indian J. Med. Res, 268–278.

Thompson J and Bannigan J. (2008) Cadmium: Toxic effects on reproductive system and the embryo. Reprod Toxicol, 25: 304-315.

Turner RM (2003) Tales from the tail: what do we really know about sperm motility?. Journal Andrology, 24: 790-803.

Vallente RU, Cheng EY, Hassold TJ. (2006) The synaptonemal complex and meiotic recombination in humans: new approaches to old questions. Chromosoma, 115: 241-249.

Van Waeleghem K, De Clercq N, Vermeulen L, Schoonjans F, Comhaire F. (1996) Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men. Hum reprod, 11: 325-329.

Vialard F, Petit C, Bergere M, Gomes MD, Martel-Petit V, Lombrosos R, Ville Y, Gerard H and Selva J. (2006) Evidence of a high proportion of premature unbalanced separation of sister chromatids in the first polar bodies of women of advanced age. Human Reprod, 21: 1172-1178.

Vigier M, Weiss M, Perrard MH, Godet M and Durand P. (2004) The effect of FSH and of testosterone on the completion of meiosis and the very early steps of spermiogenesis of the rat: an in vitro study. J Mol Endocrinology, 33: 729-742.

Vinken M, Vanhaecke T, Papeleu P, Snyckers S, Henkens T, Rogiers V. (2006) Connexins and their channels in cell growth and cell death. Cell signal, 18: 592-600.

Von Burg R and Liu D. (1993) Chromium and hexavalent chromium. J. Appl. Toxicol, 13: 225–230.

Waalkes MP. (2003) Cadmium carcinogenesis. Mut Res, 5: 107-120.

Warren DW, Pasupuleti V, Lu Y, Platler BW, Horton R. (1990) Tumor necrosis factor and interleukin-1 stimulate testosterone secretion in adult male rat Leydig cells in vitro. J Androl, 11: 353-360

Watanabe T, Koizumi A, Fujita H, Kumai M, Ikeda M. (1984) Role of rice in dietary cadmium intake of farming population with no known man-made pollution in Japan. Tohoku J Exp Med, 144: 83-90.

Weber JE, Russell LD, Wong V, Peterson RN. (1983) Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell. II. Morphometry of Sertoli-Sertoli end sertoli-germ cell relationships. Am J Anat, 167: 163-179.

WHO. Cadmium-environmental aspects (Environmental Health Criteria 135). Geneva, 1992

World Health Organization WHO. Laboratory Manual for the examination of human semen and semen cervical mucus interaction. Cambridge University press, Cambridge UK, 1992, 1999.

Witorsch RJ. (2002) Endocrine disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted? Regul Toxicol Pharmacol, 36: 118-130.

Xia W, Wong EWP, Mruk DD, Cheng CY. (2009) TGF-β3 and TNFα perturb blodd-testis barrier (BTB) dynamics by accelerating the clathrin-mediated endocytosis of integral membrane proteins: a new concept of BTB regulation during spermatogenesis. Dev Biol, 327: 48-61.

Xu H, Beasley MD, Warren W, van der Horst G and McKay M. (2005) Absence of Mouse REC8 Cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. Developmental Cell, 8: 949-961.

Yan HH, Mruk D, Lee WM, Cheng CY. (2008) Blood testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects bon the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cell FASEB J, 22: 1945-1959.

Yoshida S, Takakura A, Ohbo K, Abe K, Wakabayashi J, Yamamoto M, Suda T, Nabeshima Y. (2004) Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. Dev Biol, 269: 447–458.

Zickler, D., Kleckner, N. (1998) The leptotene-zygotene transition of meiosis. Annu. Rev. Genet, 32: 619-697.