

## STUDY OF INTRA TESTICULAR REGULATIONS OF SPERMATOGENESIS DIFFERENTIATION BY EX-VIVO APPROACH

A. Adaika\*, B. Barenton and P. Durand

Département de chimie, Centre Universitaire d'El-Oued, B.P.789 El-Oued 39000,  
Algérie.

Received: 25 June 2010 / Accepted: 06 December 2010 / Published online: 31 December 2010

---

### ABSTRACT

The aim of this work is to study the regulation of intratesticular during spermatogenesis ex vivo. To highlight the progress of spermatogenesis ex vivo, we developed two cell culture systems of seminiferous tubules to study the role of local factors that control the proliferation and differentiation of male germ cells. Our studies are based on two main techniques: RT-PCR and RNA extraction to examine changes in the expression of some growth factors in the culture of seminiferous tubules as the SCF, c-Kit and TGF $\beta$ . The results show, using RT-PCR, that expression of SCF, c-Kit and TGF $\beta$  is probably not involved in the alterations of spermatogenesis ex vivo. Indeed, their expressions are not modified during three weeks of culture, and their expressions depend on the proportion of cells where they are expressed. Our results also show that clusterin is a marker of Sertoli cells in the culture of seminiferous tubules and its expression is not altered by the presence of germ cells.

**Keywords:** Spermatogenesis, Sertoli cells, RT-PCR, SCF, c-Kit, TGF $\beta$ , clusterin.

---

Author Correspondence, e-mail: [adika\\_aicha@yahoo.fr](mailto:adika_aicha@yahoo.fr)

[ICID: 1020816](#)

## 1. INTRODUCTION

La décroissance du taux de fertilité est devenue très importante. Face à la responsabilité masculine et féminine dans les causes de l'infertilité, l'infertilité masculine est difficile à traiter, car elle est souvent due à des troubles primitifs de la spermatogenèse, pour lesquels nous manquons de traitement efficace.

S'il est couramment admis que le système endocrinien contribue à la régulation de la spermatogenèse, le testicule est également dépendant du contrôle local exercé par des facteurs qui modulent de façon complexe l'action hormonale et qui régissent les interactions entre les différents types cellulaires[1]. La croissance, la différenciation et l'apoptose des cellules germinales sont ainsi très finement régulés par des facteurs de croissances[2]. Parmi ceux-ci, on distingue les familles du Stem Cell Factor, Transforming Growth Factor- $\beta$ , Insulin -Like Growth Factor et Neurotrophine[3, 4]. En outre, il a été montré récemment que des souris mâles dépourvues de la sous unité  $\beta$  de la FSH présentent une spermatogenèse normale et sont fertiles[5], Dans ce contexte, notre équipe a développé des systèmes de culture des cellules de tubes séminifères[7], permettant d'étudier le rôle de facteurs locaux[6]. Les raisons pour lesquelles nous avons porté notre choix sur ces facteurs sont que les études antérieures montrent que l'absence ou la surexpression de SCF/c-Kit et TGF $\beta$  provoque une altération de la spermatogenèse[8, 9, 10]. Pour ce fait, plusieurs hypothèses ont été suggérées comme l'évolution de l'expression de celles-ci au cours de la culture de tubes séminifères et en quoi ceux-ci sont capables de modifier la physiologie de la cellule germinale. Est- on capable de mieux comprendre ce dialogue?.

Notre hypothèse est qu'il doit y avoir un problème de la régulation locale par des facteurs intratesticulaires.

## 2. MATERIELS ET METHODES

### 2.1. Animaux

Les testicules sont prélevés sur des rats Sprague Dawley de 20 à 23 jours, sacrifiés par asphyxie au CO<sub>2</sub>.

### 2.2. Culture de tubes séminifères issus de testicules de rats de 23 jours

La culture consiste à cultiver des petits fragments de tubes séminifères dont la membrane basale a été altérée par la collagénase. Ainsi, au bout de quelques jours, les cellules intra-tubulaires migrent et colonisent la totalité de la surface de l'insert.

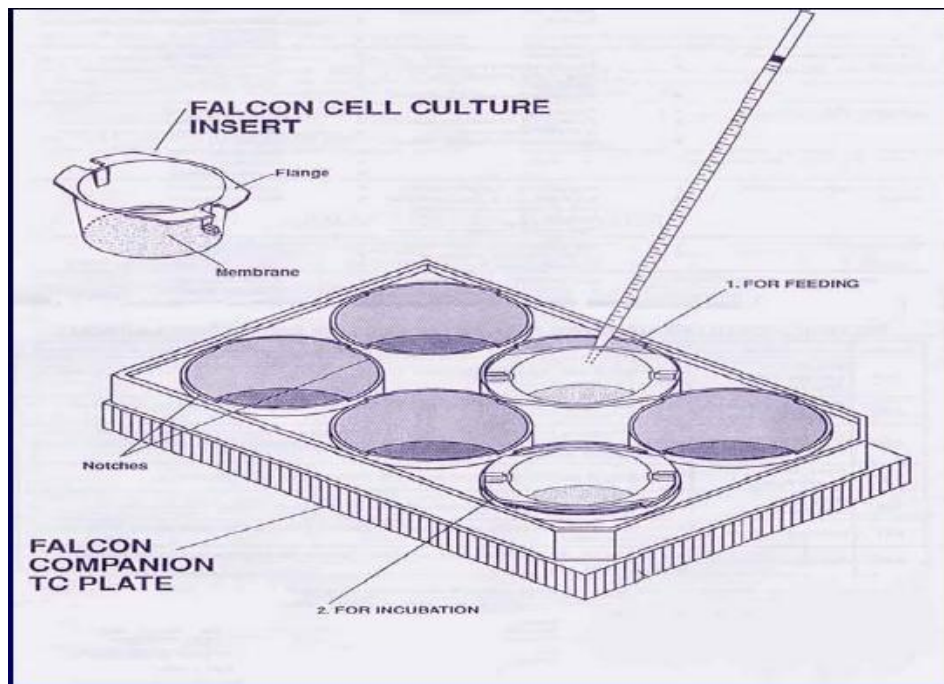
Les testicules des rats sont prélevés et stockés dans du F12/DMEM mélangés à des antibiotiques (pénicilline–streptomycine) et à un antifongique (nystatine). Les testicules sont décapsulés (on enlève la capsule fibreuse: l'albuginée) à l'aide d'un scalpel, puis une première digestion est effectuée avec la collagénase dans un bain marie à 33° C pendant 15min sous agitation manuelle afin de séparer les tubes séminifères entre eux, Cette enzyme est éliminée par une centrifugation de 10 min, le culot obtenu est resuspendu dans du milieu de culture F12/DMEM+Antibiotique (Tableau 1).

**Tableau 1.** Composition de milieu de culture MDEM/F12

Milieu F12/DMEM Complet	
Poudre DMEM NUT MIX F12 (Gibco Brl, France)	15,57g/l
Insuline	1,7mM
Transferrine	1,3. 10-4mM
Vitamine C	0,1 mM
Vitamine E	0,23 mM
Rétinol	3,3. 10-4 mM
Acide rétinoïque	3,3. 10-4 mM
Testostérone	10-4 mM
Pyruvate	1 mM
FSH	1,7. 10-7mM
+ Antibiotique	
Gentamycine (Antibiotique)	1 ml/l
Nystatine (Antifongique)	4,75. 10-4mM (10-5 UI/I)

Puis deux sédimentations successives de 10 min sont effectuées pour éliminer les cellules de Leydig et les débris cellulaires. Le culot de sédimentation, contenant les tubes séminifères, est ensuite transféré dans une boîte de Pétri pour subir une dissociation mécanique à l'aide de deux scalpels pendant 10 minutes, jusqu'à obtenir des petits fragments des tubes séminifères en vérifiant régulièrement la dissociation sous le microscope. Une seconde digestion, identique à la première, est réalisée à 33° C dans le but d'altérer la membrane basale des tubules et permettre la migration des cellules hors de tubes séminifères. La collagénase est à nouveau éliminée par

centrifugation, puis le culot obtenu est repris par du milieu complet (DMEM + cofacteurs), les tubes sont ensuite ensemencés dans des inserts Costar dans les chambres bicamérales (Fig.1). La culture s'effectue à 33° C pendant vingt jours.



**Fig.1.** la chambre de culture « bicamérale » d'après un prospectus de la maison Falcon

### 2.3. Les méthodes d'analyse immunocytologique

#### 2.3.1. Trypsination et fixation des cellules de la culture des tubes séminifères

Les milieux apicaux de 6 inserts pour chaque prélèvement (à J4, J12 et à J20) sont récupéré, les tapis de cellules sont rincés avec du PBS-1X. Les volumes de rinçage sont à leur tour récupérés et poolés avec les milieux apicaux. Les tapis cellulaire sont décollées 5 min à 33° C avec de la trypsine –EDTA à 25µg/100µl à 37° C. Une fois l'enzyme inactivée par un inhibiteur de trypsine, les cellules sont récupérés et centrifugées avec les surnageants précédemment prélevés pour éliminer la trypsine. Le culot est repris dans 1ml de PBS-1X et la viabilité cellulaire est déterminée par le comptage des cellules sur cellule de Thomas après coloration au bleu de Trapan dilué au demi (qui permet de colorer en bleu les cellules mortes).

#### 2.3.2. Fixation des cellules

Après l'étalement de deux spots de 10µl pour chaque suspension cellulaire obtenue après la trypsination par lame poly-lysine, les lames sont séchées à l'air libre et sont ensuite trempées dans une cuve remplie de méthanol froid pendant 5 min pour fixer les cellules. À la fin, les lames sont rincées et conservées dans du PBS 1X à +4° C.

### **2.3.3. Détermination de la proportion des cellules de Sertoli et des cellules germinales**

Pour mettre en évidence la proportion des cellules germinales et des cellules de Sertoli, nous avons choisi la vimentine (protéine de cytosquelette) .

Une fois les cellules fixées, elles sont ensuite perméabilisées au Triton X100 (0, 03%) pendant 30 minutes afin de rendre la vimentine accessible à l'anticorps anti-vimentine. Après rinçage dans du PBS, les dépôts cellulaires sont recouverts d'eau oxygénée afin d'enlever les peroxydases endogènes présentes dans le testicule. Cette opération, tout comme les étapes suivantes, est à réaliser en chambre humide pour ne pas déshydrater les cellules. Entre chaque étape, les lames sont rincées dans un bain de PBS de 10 minutes. Les cellules sont placées en contact de l'anticorps anti-vimentine de souris dilué au 1/100°. Puis les lames sont placées 120 minutes à température du laboratoire. L'Ac anti-vimentine est révélé par l'anticorps secondaire biotinylé anti-souris pendant 30 minutes à température ambiante.

La streptavidine couplée à la peroxydase est ajoutée par la suite, et le tout est laissé 30 min à température de la pièce. Enfin, la révélation se fait par l'AEC, qui est laissé 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont contre colorées à l'hématoxyline de Meyer. L'AEC et l'hématoxyline de Meyer sont dénaturés par l'alcool et par les solvants organiques.

### **2.4.4. Marquage de cellules par un anticorps anti-SCF et anti-vimentine par la fluorescence pour déterminer la localisation de l'expression du SCF**

Les cellules de tubes séminifères sont fixées au méthanol comme précédemment puis placées dans un bain de triton 0.03% pendant 30 minutes afin de perméabiliser les cellules. Ensuite les cellules sont placées en contact avec l'anticorps anti-SCF de lapin dilué au 1/50° et anti-vimentine de souris dilué au 1/300°. Puis les lames sont placées toute la nuit à 4° C. L'Ac anti-SCF est révélé par l'anticorps II de chèvre anti-lapin couplé à la cyanine3, et un anticorps II de lapin anti-souris couplé au FITC pour l'anti vimentine pendant 1h à 4° C. Entre chaque étape, les lames sont rincées dans un bain de PBS 3 fois pendant 10 min .

### **2.3.5. Extraction de l'ARN total des cellules de tubes séminifères de rats de 23 jours**

l'ARN des cellules est isolé par une méthode « classique » d'extraction d'ARN au TRizol® Reagent (Invitrogen).

Après avoir éliminé les milieux apicaux de chaque insert des 6 puits réservés pour cette manipulation, les culots secs sont repris par une solution de Trizol qui va lyser les cellules et permettre une dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. Les ARN contenus par ces cellules vont être ainsi libérés. Après agitation, le chloroforme est ajouté à l'ensemble. En présence de chloroforme, l'eau et les autres dissolvants contenus dans le tube comme le phénol se mélangent mal. On obtient 3 phases : (supérieure, intermédiaire et inférieure)

La quasi-totalité des ARN se rassemblent dans la phase aqueuse (supérieure). Cette phase est récupérée et mise en présence d'isopropanol. Cet alcool va permettre la précipitation de l'ARN. Après la centrifugation, le culot d'ARN précipité est lavé avec de l'éthanol 75%. Ensuite les ARN sont à nouveau centrifugés le surnageant est éliminé. Après avoir repris les culots par 20µl d'eau stérile, les ARN sont dosés par spectrophotométrie (en diluant au 1/30<sup>ème</sup>). Le ratio et la concentration en ARN sont ensuite calculés de la manière suivante :

- Ratio:  $R = DO_{260} / DO_{280}$

A 260nm, on mesure l'absorbance des acides nucléiques.

A 280nm, on mesure l'absorbance des protéines.

Ce ratio permet de déterminer la pureté de l'échantillon en ARN. Théoriquement le ratio doit être supérieur ou égal à 1.6 pour une bonne préparation d'ARN.

### **2.3.6. La RT-PCR**

#### ***La Rétro Transcription (RT)***

A partir des ARN extraits précédemment, on ajoute un volume d'ARN dans un tube Eppendorf stérile correspondant à 3µg d'ARN, on complète avec de l'eau stérile jusqu'à 15µl. Après agitation, les tubes sont placés 10 min à 70°C dans un bloc chauffant pour permettre la linéarisation des ARN, tout de suite après, les tubes sont gardés dans la glace. Ensuite, 9µl de MIX sont ajoutés. Ce MIX contient entre autres (tableau 2) une enzyme: la RNase OUT. Celle-ci permet de dégrader les possibles RNases qui se trouveraient dans le tube et qui pourraient détruire les ARN. L'ensemble est par la suite placé dans un bain marie à 37°C pendant 1 heure afin que se réalise la rétro transcription. Le tube contenant maintenant de l'ADN complémentaire (ADNc) est placé dans le bloc chauffant à 70°C pendant 10 min afin de dégrader la reverse transcriptase. L'ADNc est dilué 3 fois et conservé à -20°C.

**Tableau 2.** Composition du Mix pour la RT.

	Volume pour 1 tube (µl)
dNTP	1.5
Oligo dt ou lower	1
Buffer 5X M-MLV	5
RNa sin	0.5
M-MLV RT	1
Volume total	9

**La PCR (Polymérase Chain Réaction)**

Cette méthode de biologie moléculaire permet d'amplifier de manière conséquente le nombre de copies d'une séquence spécifique d'ADN. Celle-ci se fait selon trois étapes que l'on renouvelle au maximum 35 fois pour visualiser la séquence spécifique de l'ADNc recherché : **La dénaturation** (94°C), **L'hybridation**(58 et 60°C), **L'élongation** (72°C).

1µl d'ADNc dilué au tiers est placé dans chaque tube. 20µl de MIX (Tableau 3) sont ajoutés.

**Tableau 3.** Composition du Mix pour la PCR

	Volume pour 1 tube (µl)
MgCl <sub>2</sub> 25mM (2mM final)	2
dNTP 1mM (250µM final)	6.25
Buffer 10X	2.5
Amorce SENS 100µM	0.5
Amorce ANTISENS 100µM	0.5
Eau sterile	9
Taq polymérase	0.2
Volume total	20.95

Lorsque le MIX est ajouté, les tubes sont prêts à être placés dans l'appareil à PCR. Suivant les amorces utilisées (Tableau 4), le nombre de cycles et les températures de certaines étapes du cycle peuvent être modifiées.

**Tableau 4.** Les différentes amorces sens et anti-sens utilisées

	AMORCE 5'-----3'	Référence de séquence	PM pb
<b>SCF</b>	Sens : CCTTATGAAGAAGACACAAACTTGG Anti-sens : CTAAAGAATTCTTCAGGAGTAAAG	<u>NM_021843</u>	<b>429</b>
<b>c-Kit</b>	Sens : ATCCAGCCCCACACCCTGTT Anti-sens : TGTAGGCAAGAACCATCACAATGA	NM_022264	<b>92</b>
<b>TGFβ</b>	sens : GAGAGCCCTGGATACCAACTACTGCTTC Anti-sens : CTGTGTGTCCAGGCTCCAAATGTAGG	<u>NM_021578</u>	<b>175</b>
<b>Clusterine</b>	sens : GTGTCCTGAGGTGGTGGTG Anti-sens : CGCTGGAGACATGTGGAGTT	<u>NM_053021</u>	<b>348</b>
<b>TP1</b>	sens : CCAGCCGCAAACCTAAAGACTCAATGG Anti-sens : AGCTCATTGCCGCATTACAAGTGGG	<u>NM_017056</u>	<b>175</b>
<b>TH2B</b>	Sens: GTCGGCAAAGGGGACTACTATTTCC Anti-sens : TTGGAGCTGGTGTACTTGGTGAC	NM_022643	<b>369</b>
<b>L19</b>	sens : GGTGACCTGGATGAGAAGGA Anti-sens : TTCAGCTTGTGGATGTGCTC	NM_009078	<b>162</b>

Un témoin a été utilisé : PCR<sub>0</sub>. Ce tube contient tous les réactifs sauf l'ADNc. De l'eau stérile a été rajoutée à la place.

Plusieurs PCR ont été faits avec différents nombres de cycles pour déterminer à chaque fois l'expression optimale des gènes au cours de la culture (la saturation de l'amplification ne permet pas de différencier le niveau d'expression).

Afin de visualiser les amplicons obtenus par la PCR, on réalise une migration par électrophorèse.

#### ***La migration par électrophorèse***

Un gel d'agarose de 2 % est réalisé. 2g d'agarose sont dissous dans 100ml de tampon TBE 0.5X (Tris Borate EDTA) en chauffant la solution à une température supérieure à 90°C au micro-onde. En effet, la poudre d'agarose ne se dissout qu'au-delà de cette température. Après refroidissement à une température avoisinant les 50°C, 4µl de BET sont ajouté. Le BET est à manipuler avec précaution sous une hotte chimique car c'est un intercalant nucléaire fluorescent. En effet, il est visible, avec une couleur rouge orangée, sous rayonnements ultraviolets. Le gel, encore liquide, peut désormais être



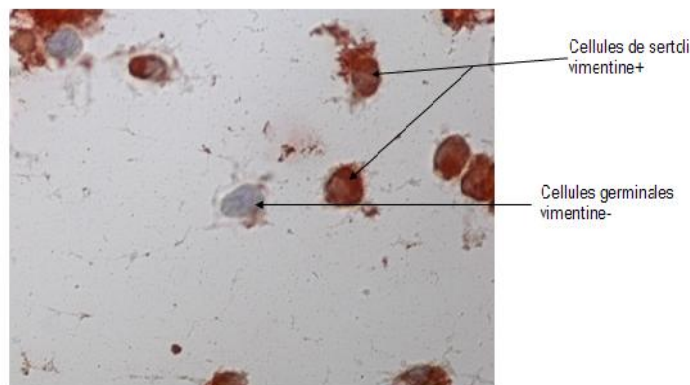
coulé dans un moule approprié et prendre en masse en 30 minutes. Une fois solide, le gel est placé dans une cuve à électrophorèse remplie de TBE 0.5X. Les puits destinés à recevoir les produits de la PCR sont placés au niveau de la cathode. Les produits de la PCR sont déposés dans les puits du gel sans ajouter le bleu de dépôt par ce que le tampon de la Taq contient une substance qui permet de voir le front de migration et du glycérol, qui, du fait de sa forte densité permet aux solutions d'aller au fond des puits. La cuve est mise sous tension (100, 50 ou 25 V) pendant environ 30 minutes (selon le gel, la taille des fragments à révéler...). Le gel est ensuite observé sous un rayonnement ultraviolet afin de détecter les bandes recherchées.

### 3. RESULTATS ET DISCUSSION

Notre laboratoire s'intéresse notamment aux mécanismes moléculaires qui contrôlent la différenciation des cellules germinales *ex vivo*. Il a été montré que le déroulement de la méiose a été bien réalisé *ex vivo* mais, présente une diminution du nombre des spermatides rondes ainsi que du nombre de spermatocytes I à la fin de la culture de tubes séminifères. L'hypothèse qui a été posée est de savoir si les causes de ces anomalies sont à la base de certains types d'infertilité.

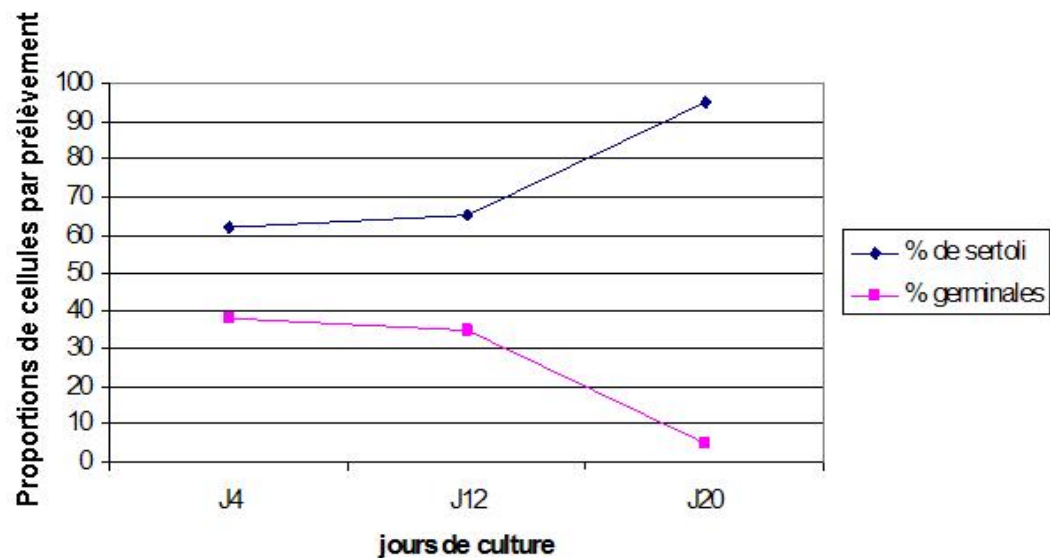
A ce titre, nous avons entrepris de caractériser les facteurs de croissance pouvant être impliqués dans ces processus.

Nous avons dans un premier temps étudié la proportion de chaque population cellulaire au cours de la culture. En effet, nous avons noté une diminution du nombre total de cellules de tubes séminifères au cours de la culture. Dans le but de préciser quel type cellulaire diminuait, nous avons effectué un marquage par un anticorps anti-vimentine afin de distinguer les cellules de Sertoli (vimentine +) et les cellules germinales (vimentine -)(Fig.2).

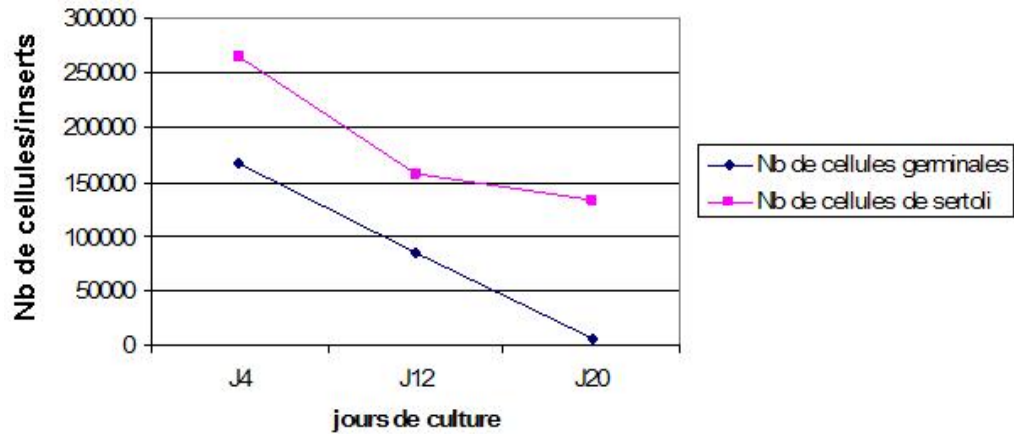


**Fig.2.** marquage des cellules de tubes séminifères de rat de 23 jours avec l'AC anti-vimentine

La proportion de cellules germinales ainsi que leurs nombres par insert diminuent fortement au cours de culture de tubes séminifères-(Fig.3), cette diminution reflète la perte des cellules germinales. En revanche la proportion des cellules de Sertoli augmente régulièrement au cours de la culture par rapport au nombre total des cellules comptées, cela est dû au fait de la diminution du nombre des cellules germinales, alors que le nombre de cellules de Sertoli par insert diminue légèrement au cours de la culture-(Fig.4).



**Fig.3.** la proportion de cellules germinales et de cellules de sertoli dans la culture de tubes séminifère de rat de 23 jours

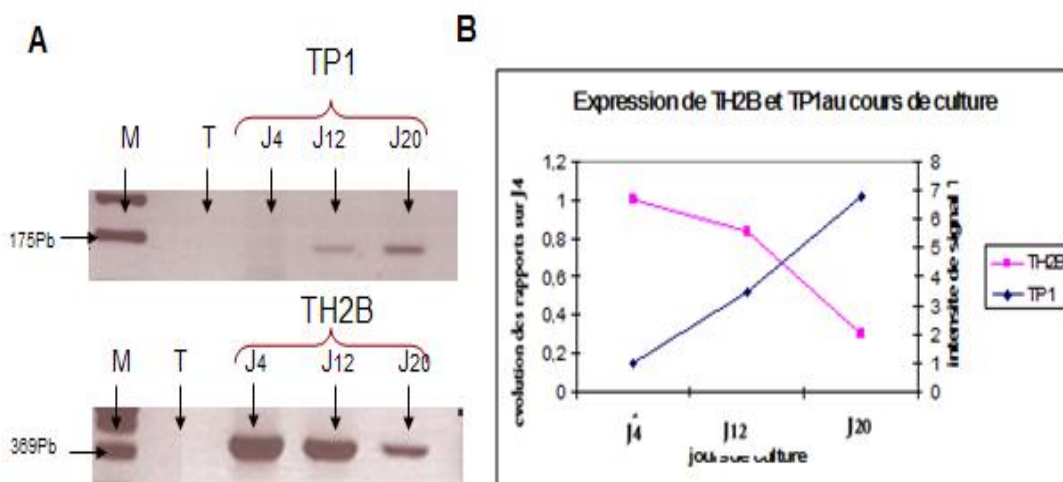


**Fig.4.** le nombre de cellules germinales et de cellules de sertoli par insert dans une culture de tubes séminifères.

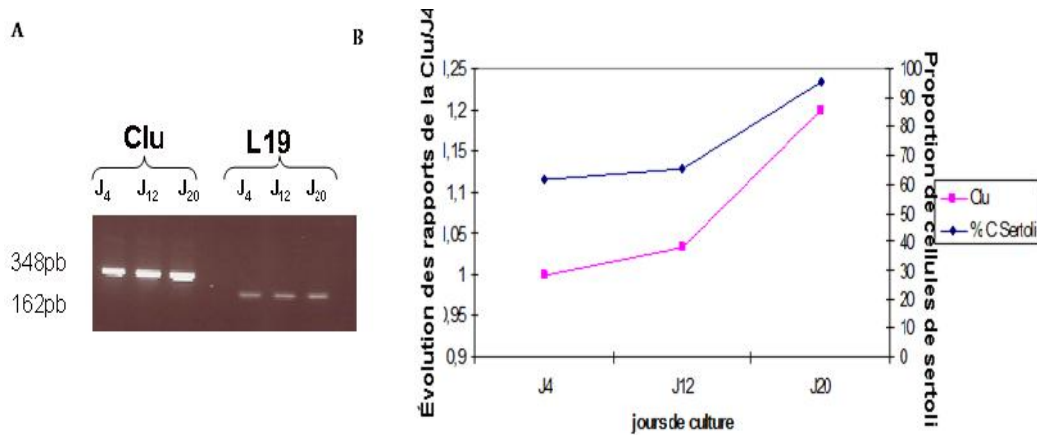
L'étude de l'expression des gènes pré et post méiotique est un passage obligatoire dans ce travail [11]: elle permet de caractériser le déroulement de la méiose et l'obtention des spermatides rondes au cours de la culture de tubes séminifères *ex vivo* [7] .

Les résultats présentés dans notre étude montrent, par RT-PCR, l'expression différentielle des gènes TP1 et TH2B *ex vivo*.

En effet, chaque stade de différenciation correspond une expression très spécifique de gènes. Ainsi, le gène TH2B a été décrit comme spécifique de cellules pré-méiotique (spermatocytes pachytènes), alors que le gène TP1 a été décrit comme spécifique des cellules post-méiotique (spermatides rondes)[12]. Ces résultats montrent la différenciation des spermatocytes pachytènes en spermatides rondes *ex vivo* due à la chute de l'expression de TH2B, et également l'apparition de l'expression de TP1-) (Fig.5).



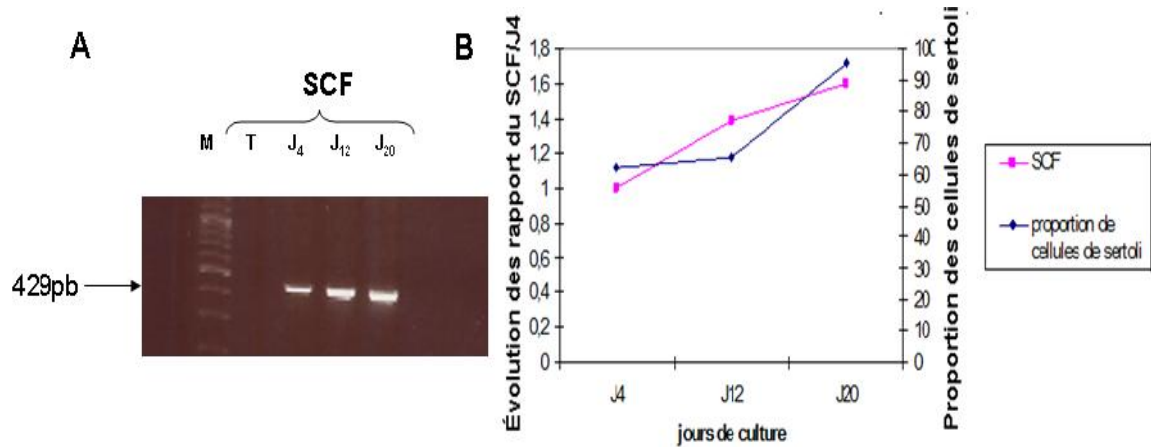
**Fig.5.** évolution de l'expression de gènes TP1 et TH2B au cours de la culture de tubes séminifères de rat de 23 jours, A: la migration sur un gel électrophorèse. B: la présentation graphique de rapport de l'intensité de signal sur J4 du chaque gène. Après avoir validé notre culture par le déroulement de la méiose *ex vivo*, nous avons pu étudier l'expression de nos gènes d'intérêt SCF/c-Kit et TGFβ. L'augmentation de l'expression de la clusterine à la fin de la culture reflète l'augmentation de la proportion des cellules de Sertoli dans l'ensemble des cellules de tubes séminifères-) (Fig.6).



**Fig.6.** Amplification de la clusterine et L19 (comme un témoin interne) par la RT-PCR au cours de la culture de tubes séminifères de rat de 23 jours. A: migration sur un gel électrophorèse; B: évolution des rapports de l'expression de la clusterine sur J4 et la proportion de cellules de sertoli

Des études précédentes montraient la stabilité de l'expression de la clusterine dans la culture de cellules de Sertoli seules. Dans cette étude nous avons pu montrer que l'expression de la Clusterine est parallèle à la proportion de cellules de Sertoli au cours de la culture, et que son expression n'est pas modifiée par la présence des cellules germinales.

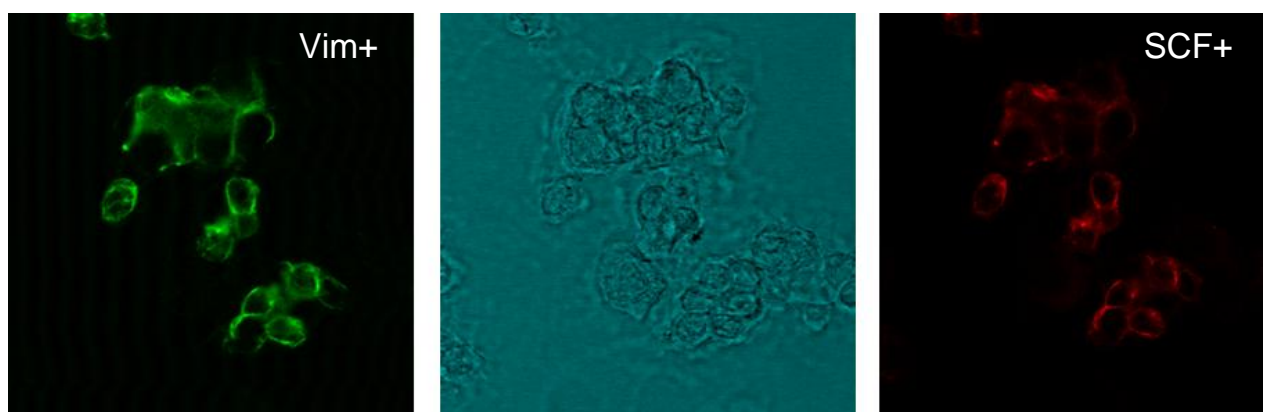
Les résultats présentés dans cet article, montrent que l'expression du SCF augmente légèrement à 20 jours de culture de tubes séminifères-) (Fig.7).



**Fig.7.** expression du SCF par la RT-PCR au cours de la culture, A: migration sur un gel électrophorèse, B: l'évolution des rapports de l'expression du SCF sur J4 et la proportion de cellules de Sertoli.

Cette constatation est surprenante car la littérature incrimine le SCF dans nombreux processus de prolifération et de survie cellulaire [13, 14]. Alors que dans notre cas nous observons une diminution des spermatocytes I et aussi de la différenciation de ceux-ci en spermatides rondes au cours de la 3<sup>ème</sup> semaine de culture. Donc le SCF ne semble pas être responsable de ce problème.

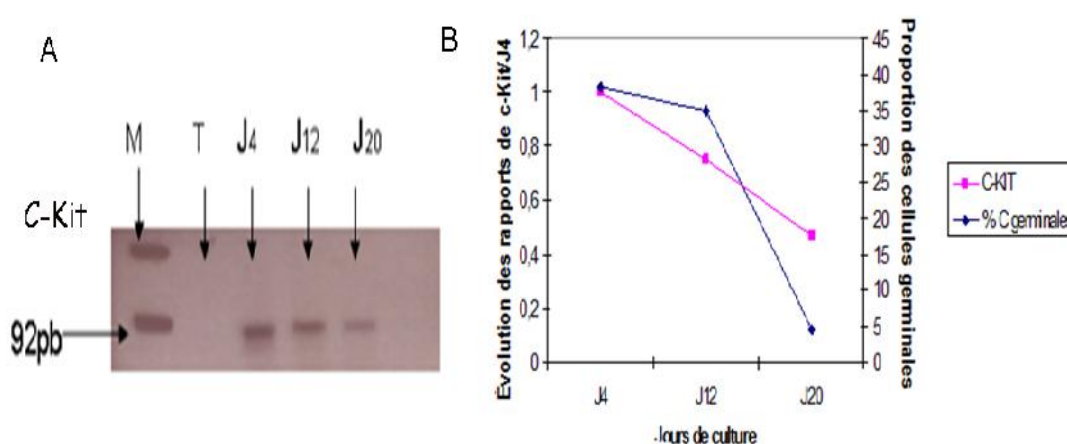
Le rapport SCF/Clusterine est stable durant les 3 semaines de culture. Les études immunocytochimiques par le marquage avec anti-SCF ont montré la localisation de l'expression du SCF que dans les cellules de Sertoli chez le rat de 23 jours-) [13, 16] (Fig.8). Cela nous permet de conclure que l'expression du SCF par les cellules de Sertoli n'est pas modifiée au cours de la culture.



**Fig.8.** La révélation de la localisation de SCF dans les cellules de tubes séminifères de rat de 23 jours. A: pour la vimentine par une anti-souris couplée au FITC (en vert) ; B: par un anti-lapin couplé à la cyanine3 (en rouge) pour le SCF

D'après les résultats du SCF nous avons décidé d'étudier l'expression de son récepteur (c-Kit) au cours de la culture.

Une diminution de l'expression d'ARNm de c-Kit au cours de la spermatogénèse *ex vivo* a été observée-(Fig.9). Cette diminution est concomitante avec celle de la proportion des cellules germinales où il est exprimé.

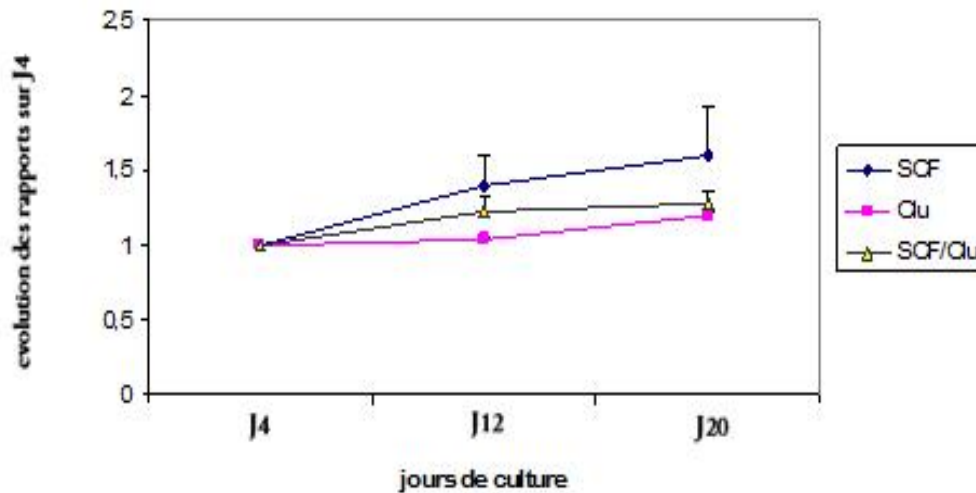


**Fig.9.** expression de gène du c-Kit par la RT-PCR au cours de la culture de tubes séminifères de rat de 23 jours, A: migration sur gel électrophorèse. B: évolution des rapports de l'expression de c-Kit sur J4 et la proportion des cellules germinales.

Nous avons expliqué la diminution de l'expression de c-Kit par la perte de cellules germinales à la fin de la culture de tubes séminifères, mais cette diminution est moins importante à J20 que celle de la proportion de cellules germinales. Les résultats ne plaident donc pas en faveur d'une diminution de l'expression de c-Kit par les cellules germinales restants. Il a été montré dans les études précédentes, la présence des spermatogonies à la fin de la culture au cours de la méiose *ex vivo*; or ces cellules expriment fortement c-Kit. De ce fait, l'expression de c-Kit à la fin de la culture est vraisemblablement due à l'existence des spermatogonies à la fin de culture.

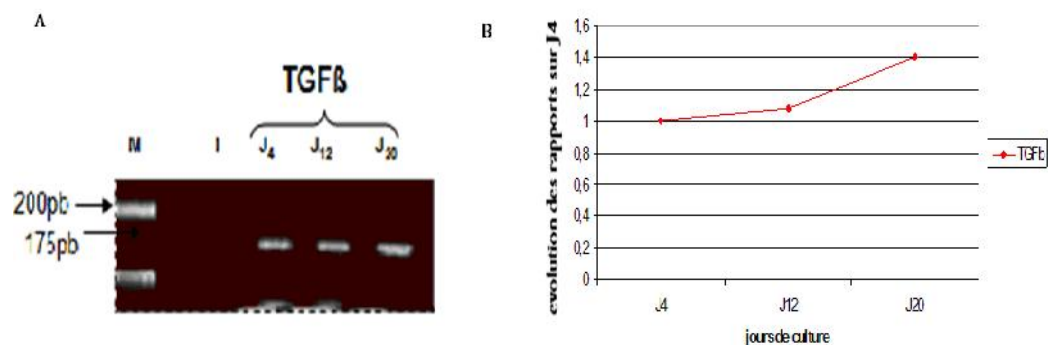
Ainsi, l'étude de l'expression du SCF/c-Kit au cours de trois semaines de culture de tubes séminifères ne montre aucune modification de leur expression-(Fig.10). En effet

les modifications de l'expression observées sont seulement par rapport à la modification de la proportion de chaque type cellulaire où ils sont exprimés. Donc le couple SCF/c-Kit ne semblerait donc pas impliqué dans ces modifications observées au cours de la spermatogenèse *ex vivo*.



**Fig.10.** l'évolution de rapports de l'expression du SCF, Clu et SCF/c-Kit au cours de la culture

De façon similaire, notre idée est partie sur l'étude de l'expression du TGF $\beta$ , qui est inhibiteur de la différenciation et de la prolifération cellulaire. L'analyse des résultats de la RT-PCR du TGF $\beta$  ne montre aucune variation significative de son expression au cours de la spermatogenèse *ex vivo*-(Fig.11).



**Fig.11.** l'expression du TGF $\beta$  par la RT-PCR au cours de la culture de tubes séminifères de rat de 23 jours, A: migration sur un gel électrophorèse, B: l'évolution des rapports de l'expression du TGF $\beta$  sur J4.

Nos premiers résultats suggèrent donc fortement que ni le système SCF/c-Kit ni le TGF $\beta$  n'interviennent dans la perturbation de la spermatogenèse *ex vivo*, en effet leurs expressions ne sont pas modifiées au cours de la culture.

Bien que nous ne puissions pas conclure sur l'expression des ces gènes, nous pouvons cependant essayer d'étudier la quantité de l'expression des protéines de SCF et de son récepteur au cours de la culture permettant d'observer leurs effets sur le déroulement de la spermatogenèse *ex vivo*.

#### 4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos résultats présentent que la clusterine est un marqueur des cellules de Sertoli dans la culture de tubes séminifères [15] et que son expression n'est pas modifiée par la présence des cellules germinales.

Les résultats présentés dans cette étude montrent, à l'aide de la RT-PCR, que l'expression du SCF, de c-Kit et du TGF $\beta$  n'est probablement pas impliqué dans les altérations de la spermatogenèse *ex vivo*. En effet, leurs expressions dépendent de la proportion des cellules où ils sont exprimés. Ces résultats devront être confirmés et approfondis.

Ces études devront être complétées par l'étude de l'expression des différentes protéines des SCF/c-Kit et TGF $\beta$  par le western blot afin de bien déterminer le taux d'expression de chaque facteur qui est soit dû à l'expression du gène, soit à la quantité de protéine exprimée.

#### 5. REFERENCES

- [1] Dadoune J. P. and Demoulin A. 1991, *Structure et fonction de testicule*, ELLIPSES, INRA, paris, 221-250 p.
- [2] Benahmed M. C. M. e. S. H. Spermatogenèse et facteurs de croissance. les jta (2000).
- [3] Damestoy A., Perrard M. H., Vigier M., Sabido O. & Durand. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005, 3, 22.
- [4] Perrard M. H. et al. *J Cell Physiol*. 2007, 210, 51-62.
- [5] Chemes H. E., Dym M. & Raj H. G. *Biol Reprod* 21. 1979, 9, 241.



- 
- [6] Perrard M. H., Prisant N., Geoffroy-Siraudin C., Segretain D., Pointis G., Guichaoua M. R., Durand P. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009, 47, 89-94.
- [7] Staub C. et al. *Exp Cell Res.* 2000, 260, 85-95.
- [8] Prabhu S. M. et al. *Reproduction.* 2006, 131, 489-99.
- [9] Sandlow J. I., Feng H. L., Cohen M. B. & Sandra A. *J Androl.* 1996, 17, 403-8.
- [10] Mauduit C., Hamamah S. & Benahmed M. *Hum Reprod Update.* 1999, 5, 535-45.
- [11] Perrard M. H. et al. *Mol Reprod Dev.* 2003, 65, 86-95.
- [12] Marret C., Avallet O., Perrard-Sapori M. H. & Durand P. *Mol Reprod Dev.* 1998, 51, 22-35.
- [13] Hakovirta H. et al. *Endocrinology.* 1999, 140, 1492-8.
- [14] Yan W., Linderborg J., Suominen J. & Toppari J. *Endocrinology.* 1999, 140, 1499-504.
- [15] Plotton I., Sanchez P., Perrard M. H., Durand P. & Lejeune H. *J Endocrinol.* 2005, 186, 131-43.
- [16] Rossi P., Albanesi C., Grimaldi P. & Geremia R. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999, 176, 910-4.

## ETUDE DES REGULATIONS INTRA TESTICULAIRES DE LA DIFFERENCIATION SPERMATOGENIQUE PAR APPROCHE *EX-VIVO*

### RESUME

Le but de ce travail est d'étudier la régulation intratesticulaire au cours de la spermatogenèse *ex vivo*. Pour mettre en évidence le déroulement de la spermatogenèse *ex vivo*, nous avons développé deux systèmes de culture des cellules de tubes séminifères, permettant d'étudier le rôle de facteurs locaux qui contrôlent la multiplication et de la différenciation des cellules germinales mâles. Nos études sont basées sur deux techniques principales : la RT-PCR et l'extraction d'ARN afin d'étudier l'évolution de l'expression de certains facteurs de croissances au cours de la culture de tubes séminifères comme les SCF, c-Kit et TGF $\beta$ . Les résultats montrent, à l'aide de la RT-PCR, que l'expression du SCF, de c-Kit et du TGF $\beta$  n'est probablement pas impliqué dans les altérations de la spermatogenèse *ex vivo*. En effet, leurs expressions ne sont pas modifiées au cours de trois semaines de la culture, et leurs expressions dépendent de la proportion des cellules où ils sont exprimés. Nos résultats présentent aussi que la Clusterine est un marqueur des cellules de Sertoli dans la culture de tubes séminifères et que son expression n'est pas modifiée par la présence des cellules germinales.

**Mots clés:** Spermatogenèse, cellule de Sertoli, RT-PCR, SCF, c-Kit, TGF $\beta$ , Clusterine.

### How to cite this article

Adaika A, Barenton B and Durand P. Study of intra testicular regulations of spermatogenesis differentiation by ex-vivo approach. J Fundam Appl Sci. 2010, 2(2), 313-330.