



ADAIKA Aicha

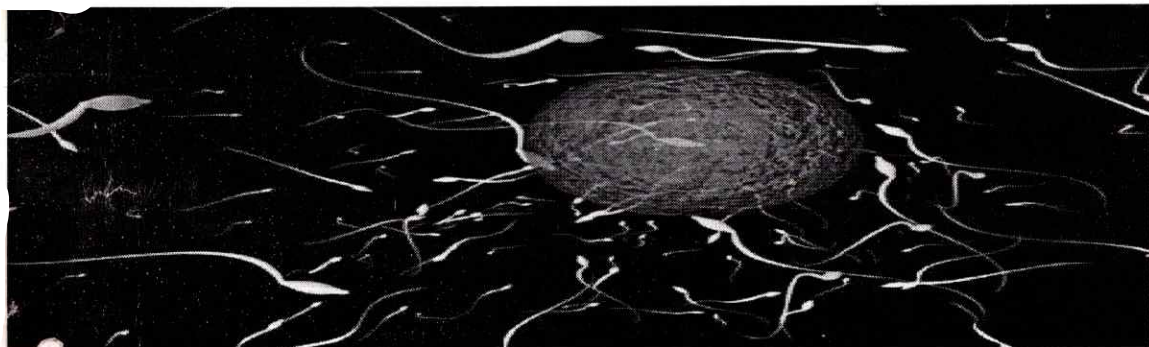
Master 2 GENETIQUE ET BIOLOGIE DE LA CELLULE

Spécialité : Génétique Fonctionnelle et Pathologie Cellulaire



Rapport Bibliographique

**Etude des régulations intratesticulaires
de la différenciation spermatogénique
par approche ex-vivo**



Responsable de recherche : **Durand Philippe**

*Laboratoire de génomique
fonctionnelle de la reproduction*



Institut de Génomique
Fonctionnelle de Lyon

**UMR5242 -CNRS-ENS
Lyon-UCBL-INRA**

Ecole Normale Supérieure de Lyon
46 allée d'Italie F-69364 Lyon cedex7, France



SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	4
2. LA PHYSIOLOGIE DU TESTICULE.....	5
3. LA SPERMATOGENESE.....	5
4. LA CELLULE DE SERTOLI : ROLE ET SECRETION SERTOLIENNES.....	6
5. ETUDE DE LA REGULATION DE LA SPERMATOGENESE	7
5.1. <i>LA REGULATION</i>	7
5.2. <i>COMMUNICATION INTRATESTICULAIRE</i>	7
6. LA SPERMATOGENESE EX VIVO.....	8
6.1. <i>Expression génique au cours de la spermatogenèse</i>	9
6.2. <i>Les études antérieures de l'équipe sur quelques facteurs de croissance</i>	9
6.2.1. <i>Importance des facteurs de croissance de la super famille des Transforming Growth Factor de type β.....</i>	9
6.2.2. <i>L'importance du Stem Cell Factor (SCF) et son récepteur c-Kit.....</i>	9
7. OBJECTIFS DE TRAVAIL	12
Matériels et méthodes.....	14
1. CULTURE DE TUBES SEMINIFERES ISSUS DE TESTICULES DE RATS DE 23 JOURS.....	14
2. LES METHODES D'ANALYSE IMMUNOCYTOLOGIQUE.....	15
2.1. <i>TRYPsinATION ET FIXATION DES CELLULES DE LA CULTURE DES TUBES SEMINIFERES</i>	15
2.2. <i>FIXATION DES CELLULES</i>	15
2.3. <i>DETERMINATION DE LA PROPORTION DES CELLULES DE SERTOLI ET DES CELLULES GERMINALES</i>	16
2.4. <i>MARQUAGE DE CELLULES PAR UN ANTICORPS ANTI-SCF ET ANTI-VIMENTINE PAR LA FLUORESCENCE POUR DETERMINER LA LOCALISATION DE L'EXPRESSION DU SCF</i>	16
3. EXTRACTION DE L'ARN TOTAL DES CELLULES DE TUBES SEMINIFERES DE RATS DE 23 JOURS	17
4. LA RT-PCR.....	18
4.1. <i>LA RETRO TRANSCRIPTION (RT).....</i>	18
4.2. <i>LA PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)</i>	19
4.3. <i>LA MIGRATION PAR ELECTROPHORESE.....</i>	21
Résultats.....	23
1. PREPARATION DES CELLULES CULTIVEES.....	23

2. COMPTAGE DES PROPORTIONS DE CELLULES DE SERTOLI ET DE CELLULES GERMINALES PAR LES METHODES IMMUNOCYTOCHIMIE.....	23
3. VERIFICATION DE LA LOCALISATION DE L'EXPRESSION DU SCF.....	25
3.1. ANALYSE DU MARQUAGE PAR UN ANTICORPS ANTI-VIMENTINE DE SOURIS REVELE PAR UN ANTI-SOURIS CONJUGUE A LA FITC	25
3.2. ANALYSE DU MARQUAGE PAR UN ANTICORPS ANTI-SCF DE LAPIN REVELE PAR UN ANTI-LAPIN CONJUGUE A LA CYANINE3.....	25
4. PREPARATION D'ARNM DES CELLULES DE CULTURE DE TUBES SEMINIFERES.....	26
5. MISE EN EVIDENCE DU PASSAGE DE LA MEIOSE AU COURS DE LA CULTURE DE TUBES SEMINIFERES DE RAT <i>EX VIVO</i> PAR EXPRESSION DES GENES SPECIFIQUES.....	26
<i>SPECIFICITE DE L'EXPRESSION DES GENES TP1 ET TH2B.....</i>	<i>26</i>
6. MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION DE CERTAIN GENES DES FACTEURS REGULATEURS INTRATESTICULAIRE DE LA SPERMATOGENESE <i>EX VIVO</i>.....	27
6.1. MISE AU POINT DES CONDITIONS D'ETUDE DES ARNm DE SCF/C-KIT ET DE LA CLUSTERINE SUR LA CULTURE DE TUBES SEMINIFERES DE RAT DE 23 JOURS	27
6.2. MISE EN EVIDENCE DES ARNm DE LA CLUSTERINE ET DU SCF/C-KIT DANS LES CELLULES DE TUBES SEMINIFERES PAR RT-PCR	28
• <u>Mise en évidence de l'ARNm de la Clusterine :</u>	28
• <u>Mise en évidence de l'ARNm du SCF</u>	28
• <u>Mise en évidence de l'ARNm de c-Kit :</u>	29
6.3. MISE EN EVIDENCE DES ARNm DU TGFβ DANS LES CELLULES DE TUBES SEMINIFERES PAR RT-PCR	29
• <u>Test de l'amplification de la TGFβ par RT-PCR</u>	29
• <u>Mise en évidence de l'ARNm de TGFβ</u>	29
7. RAPPORT DES INTENSITES DES BANDES OBTENUES PAR RAPPORT A J4 POUR LE SCF, LE C-KIT, LA CLUSTERINE ET LE TGFβ ET L'EVOLUTION DU SCF/CLU AFIN DE VOIR LEUR REPARTITION AU COURS DE LA CULTURE DE TUBES SEMINIFERES.....	30
7.1. LES RESULTATS DES RAPPORTS DU COUPLE SCF/C-KIT ET DE LA CLUSTERINE SUR J4 :	30
7.2. LES RESULTATS DE RAPPORTS DU TGFβ SUR J4.....	31
Discussion	32
Conclusion et perspectives.....	35
Référence.....	36



Nos résultats présentent 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.

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 β 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. Ces résultats devront être confirmés et approfondis.

Il serait important aussi de faire des études par l'hybridation *in situ* et par immunocytochimie afin de déterminer précisément à quel stade de développement de cellules germinales exprime plus le TGF β et le c-Kit dans l'épithélium séminifères. En effet ces gènes sont exprimés dans les différents types de cellules germinales pré et post méiotique.

Ces études devront être complétées par l'étude de l'expression des différentes protéines des SCF/c-Kit et TGF β 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.

Il serait intéressant d'étendre notre recherche à d'autres facteurs de croissance intratesticulaire, ce que l'équipe avait initié ; l'étude de la localisation de l'expression des différents facteurs de croissance pourrait être également complétée par les techniques d'hybridation *in situ*.

Une connaissance approfondie de la physiologie des facteurs de régulation de différentes étapes de la spermatogenèse devrait permettre d'améliorer le diagnostic et le traitement des pathologies testiculaires. Traiter les problèmes d'infertilité masculine permettrait peut être, à terme, d'éviter, dans certain cas, le recours à des techniques de procréation médicalement assistées dont les conséquences sur la descendance ne peuvent être encore évalués aujourd'hui.