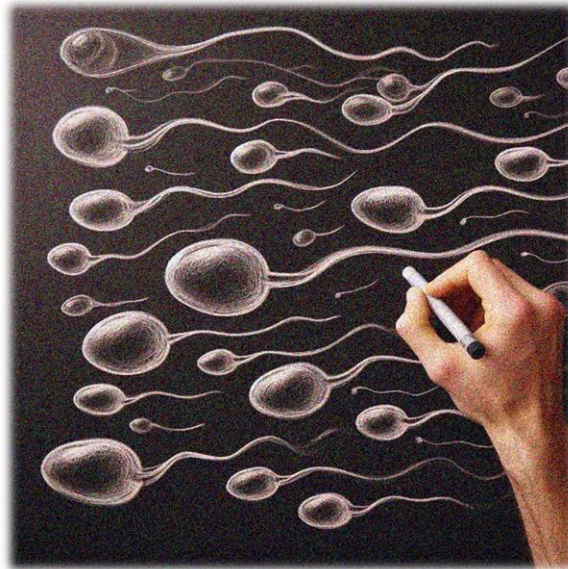


L'activation du récepteur aux cannabinoïdes de type 2 favorise la production de spermatozoïdes *in vitro*



Dr. Ludovic Dumont¹ (Ingénieur de Recherche) et la classe de 1^{ère} – Terminale du lycée Groupe Scolaire Sévigné de Mme Joséphine Villain Sawadogo² (*la liste des élèves est mentionnée en fin d'article*)

Article original/Original article : Dumont L, Rives-Feraille A, Delessard M, *et al.* Activation of the cannabinoid receptor type 2 by the agonist JWH133 promotes the first wave of *in vitro* spermatogenesis. *Andrology*. 2021 Mar;9(2):673-688.

Institutions : ¹Université de Rouen, Inserm U1239 – Différenciation et Communication Neuroendocrine Endocrine et Germinale (NorDiC), 25 Rue Lucien Tesnière, 76130 Mont-Saint-Aignan

²Groupe Scolaire Sévigné, 20 rue de la Sous-Préfecture 60200 Compiègne

Résumé :

Cet article a été écrit par 13 élèves de l'Institution Sévigné de Compiègne avec leur professeur de SVT à partir d'une étude menée par l'équipe où travaille le Docteur Dumont et avec sa collaboration. Ils se sont intéressés à un article qui démontre que l'activation du récepteur aux cannabinoïdes de type 2 favorise la production de spermatozoïdes *in vitro*. Grâce à cette réécriture, les élèves ont pu apprendre le rôle majeur des endocannabinoïdes et du récepteur de cannabinoïdes de type 2 dans le développement des cellules germinales pendant la première vague de la spermatogenèse chez la souris.

Mots clés : récepteur aux cannabinoïdes ; spermatogenèse ; spermatozoïdes ; culture organotypique ; ploïdie

1

Article en accès libre sous licence Creative Commons (CCAL) : cet article est en téléchargement et diffusion libre sans but commercial ni modification et doit être cité comme mentionné en fin d'article ou sur le site du journal.

Free access article under Creative Commons licence: this article can be downloaded and shared without any commercial purpose and cannot be modified. It must be cited as mentioned at the end of the article or in the journal website.



I État de l'Art et Introduction

Le taux de survie après un cancer chez l'enfant a augmenté grâce aux progrès remarquables réalisés dans le diagnostic et le traitement du cancer. Malheureusement, les traitements de cancers du jeune garçon ont des effets secondaires indésirables irréversibles sur les cellules souches spermatogoniales (CSS) du testicule, entraînant une infertilité à l'âge adulte. C'est pourquoi avant d'entamer un traitement pouvant être néfaste et provoquant l'infertilité du jeune garçon, il lui est proposé une conservation par congélation de son tissu testiculaire. A partir de cellules souches spermatogoniales, une des stratégies potentielles de restauration de la fertilité est de produire des spermatozoïdes *in vivo* (au sein du vivant) ou *in vitro* (sous verre). Cette technique reste de l'ordre de la recherche et ne fonctionne pas encore actuellement sur du tissu humain. La spermatogénèse (Figures 1 et 2) *in vitro* a été réalisée en laboratoire chez la souris avec la technique de culture organotypique (toute ou partie d'un organe) et permet un avantage (*i*) par sa durée de culture qui assure la production de spermatozoïdes *in vitro* à partir de CSSs et (*ii*) car elle contient toutes les cellules germinales et somatiques dans leur configuration physiologique.

De façon plus explicite, des enfants atteints de cancer vont subir des traitements qui seront néfastes pour leurs testicules (gonadotoxicité). Afin de préserver leur fertilité, les chercheurs congèlent un bout de leur testicule (composé de cellules souches uniquement car ces enfants ne sont pas encore pubères et ne possèdent pas encore

de spermatozoïdes). Lorsque ces enfants seront devenus adultes et qu'ils auront un projet parental, une des solutions envisageables pour leur permettre d'enfanter est de transformer leurs cellules souches en spermatozoïdes pour ensuite effectuer une fécondation *in vitro* (FIV). Au laboratoire, l'équipe de recherche a travaillé depuis plus de 10 ans sur la congélation (qui fonctionne maintenant très bien, même chez l'humain). Cependant, la production de spermatozoïdes à partir de cellules souches chez l'humain n'est pas encore applicable et le rendement chez la souris reste encore faible.

Des recherches effectuées en laboratoire chez la souris (Figure 3) ont mis en évidence la possibilité de générer *in vitro* une spermatogénèse complète et fonctionnelle (avec l'obtention d'une descendance) à partir de tissus de souriceaux prépubères (6 jours) après 30 jours de culture (Sato *et al.*, 2010). Cependant, le rendement en spermatozoïdes produits *in vitro* reste faible (Dumont *et al.*, 2015). Des données plus récentes ont montré que la progression méiotique et post-méiotique pourrait être altérée (Dumont *et al.*, 2016).

Il existe des lipides naturels, les cannabinoïdes endogènes (ou endocannabinoïdes), qui servent de modulateurs de la spermatogénèse (Grimaldi *et al.*, 2013) et de la reproduction (Du Plessis *et al.*, 2015). Ces endocannabinoïdes sont capables de se lier et d'activer les récepteurs aux cannabinoïdes de type 1 (CB₁) au niveau du cerveau et de type 2 (CB₂) au niveau du testicule (Li *et al.*, 2018) (Figures 4 et 5) qui miment certains effets du Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC), le composant psychoactif du Cannabis sativa (Sugiura *et al.*, 2002).

Les cellules germinales mâles mitotiques (spermatogonies) et méiotiques (spermatocytes) possèdent un

2

Article en accès libre sous licence Creative Commons (CCAL) : cet article est en téléchargement et diffusion libre sans but commercial ni modification et doit être cité comme mentionné en fin d'article ou sur le site du journal.

Free access article under Creative Commons licence: this article can be downloaded and shared without any commercial purpose and cannot be modified. It must be cited as mentioned at the end of the article or in the journal website.



système endocannabinoïde complet et actif qui est modulé au cours de la spermatogenèse. Il a été proposé que le CB₂ joue un rôle important dans l'entrée en méiose des cellules germinales mâles postnatales (Grimaldi *et al.*, 2009). Un composé chimique (le JWH133) mimant l'action d'endocannabinoïdes a donc été

ajouté pour activer les récepteurs CB₂ afin d'augmenter l'entrée en différenciation des cellules 'souches' durant la première phase de la spermatogenèse *in vitro* chez la souris. Le but de cette étude n'est donc pas d'évaluer la toxicité introduite par la toxine THC mais de se focaliser sur les actions bénéfiques de l'activation du récepteur CB₂ au sur les cellules germinales.

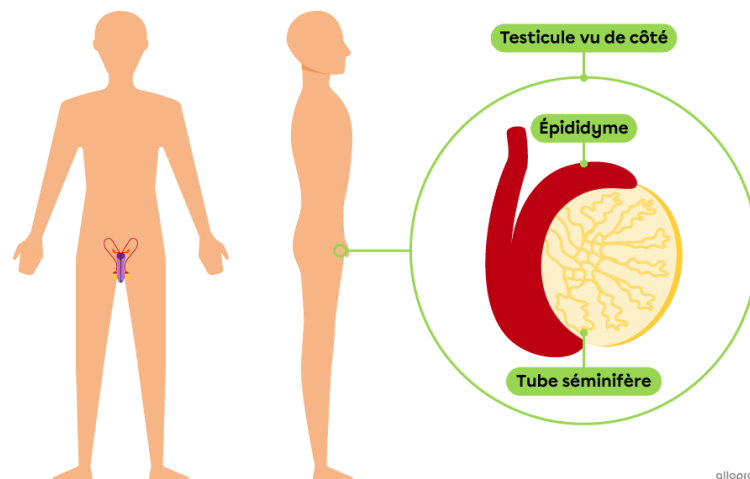


Figure 1 : Origine de la spermatogenèse. Les gamètes mâles, les spermatozoïdes, sont produits dans les tubes séminifères des testicules qui sont situés dans la gonade mâle : le testicule. Référence : <https://www.alloprof.qc.ca/fr/eleves/bv/sciences/la-spermatogenese-s1301>

Les étapes de la spermatogenèse

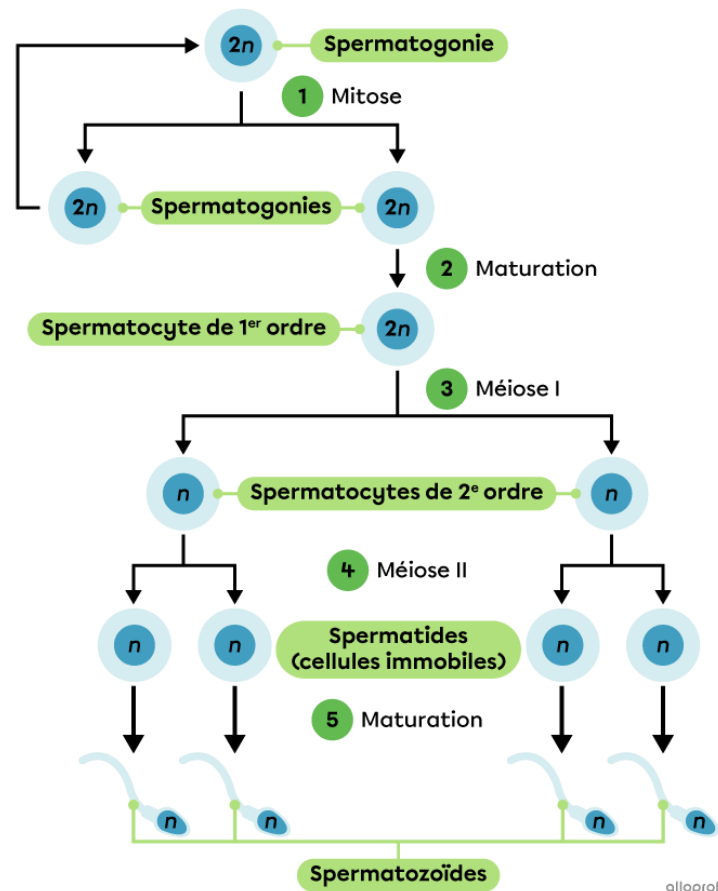


Figure 2 : Les étapes de la spermatogenèse. La spermatogenèse est le processus de production de gamètes mâles, appelés spermatozoïdes. Avant la naissance, des gamètes immatures sont produits, les spermatogonies. De la naissance à la puberté, les mitoses (processus qui conduit une cellule mère à se diviser en deux cellules « filles » génétiquement identiques. Ce mécanisme naturel est l'étape finale du cycle cellulaire.) augmentent le nombre de spermatogonies. A la puberté, la moitié des spermatogonies devient spermatoocytes de premier ordre ($2n$), $2n$ signifiant « 2 lots de n chromosomes ». Ces cellules sont diploïdes ($2n$ chromosome), c'est-à-dire qu'elles possèdent deux exemplaires équivalents (ou homologues) de chaque chromosome. La méiose I produit deux spermatoocytes de deuxième ordre (n), n signifie « 1 seul lot de n chromosomes ». Ces cellules sont haploïdes (cellule à n chromosomes), c'est-à-dire ne possédant qu'un exemplaire de chaque chromosome. A la méiose II, chaque spermatoocyte de deuxième ordre donne deux spermatoïdes. Après maturation, elles deviennent des spermatozoïdes avec tête, pièce intermédiaire et queue. Initialement immobiles, les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité en migrant des tubes séminifères vers l'épididyme. Plus de 400 millions sont produits quotidiennement. Dans cette étude, « n » est parfois noté « C » lorsqu'il s'agit d'évaluer la quantité de matériel chromosomique contenu dans une cellule. Référence : <https://www.alloprof.qc.ca/fr/eleves/bv/sciences/la-spermatogenese-s1301>

4

Article en accès libre sous licence Creative Commons (CCAL) : cet article est en téléchargement et diffusion libre sans but commercial ni modification et doit être cité comme mentionné en fin d'article ou sur le site du journal.

Free access article under Creative Commons licence: this article can be downloaded and shared without any commercial purpose and cannot be modified. It must be cited as mentioned at the end of the article or in the journal website.

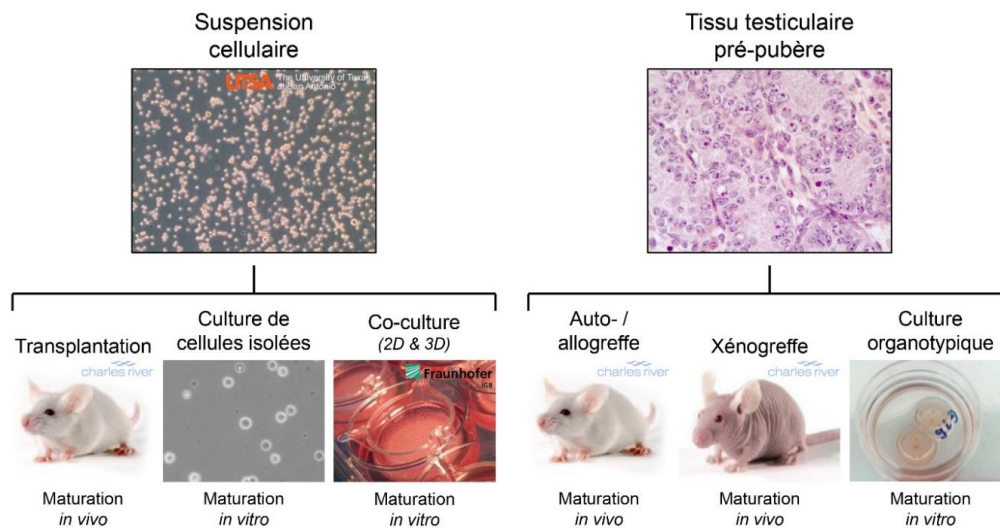


Figure 3 : Stratégies de restauration de la fertilité à partir d'une suspension de cellules germinales immatures ou des fragments de tissu testiculaire. En biologie, une transplantation consiste à injecter des cellules dans un organisme sans qu'il n'y ait forcément de vascularisation ; à l'inverse une greffe est un transfert de cellules, de tissus ou d'organe prélevé soit sur le malade lui-même ou sur un donneur impliquant fatalement une vascularisation. Afin de restaurer la fertilité, il est possible d'utiliser des cellules que l'on isole puis, que l'on transplante ou que l'on cultive dans différents supports. Cette culture peut se faire in vivo avec une transplantation au sein d'une espèce vivante ou se faire in vitro à travers une maturation isolée ou en coculture avec d'autres cellules. Il est aussi possible d'utiliser des tissus ou des parties de tissus que l'on transplante ou cultive dans différents supports comme pour l'isolation cellulaire. Une allogreffe ou une xénogreffe peut être effectuée sur un être vivant pour restaurer sa fertilité. Lors de l'allogreffe de cellules souches, on prélève des cellules souches chez une personne (donneur) puis on les administre (receveur). Tandis qu'une xénogreffe ou hétérogreffe, est une transplantation d'un organe, d'un tissu ou de cellules d'un donneur à un receveur d'une espèce différente. Cultiver de manière in vitro à travers l'utilisation d'une culture organotypique est une autre solution envisageable. C'est cette dernière qui a été employé durant cette étude sur le modèle souris. D'après Dumont (2016).

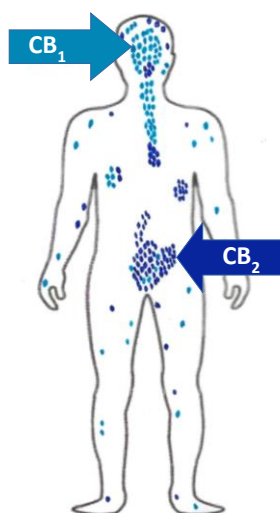


Figure 4 : Schéma illustrant la présence et la concentration des récepteurs CB₁ et CB₂ dans le corps humain, majorité du CB₂ au niveau testiculaire. Les récepteurs CB₁, sont des récepteurs couplés aux protéines G (familles de protéines à sept domaines transmembranaires). On les trouve en quantités très élevées dans le système nerveux (central et périphérique). Les récepteurs CB₂ se localisent au niveau des différentes parties du système immunitaire, le foie, le placenta et le système nerveux ainsi que dans les organes reproducteurs mâles (testicules).
Référence : <https://www.norml.fr/sante-prevention-rdr/le-systeme-endocannabinoïdes/>

Les cannabinoïdes se lient aux récepteurs aux cannabinoïdes

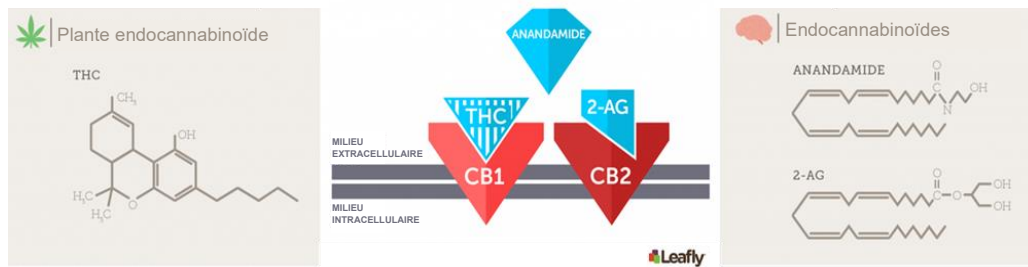


Figure 5 : Récepteurs aux cannabinoïdes CB_1 et CB_2 . Le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) est apportée par la consommation de cannabis. Il possède des propriétés psychoactives et est très nocif sur le testicule. Les endocannabinoïdes tels que la 2-arachidonoylglycérol (2-AG) et la N-arachidonoyléthanolamine (anandamide, AEA) ont un rôle bénéfique pour un système reproductif sain et fertile. Tous les « cannabinoïdes » n'ont donc pas le même effet. Le THC se fixe spécifiquement sur le récepteur CB_1 et le 2-AG sur le récepteur CB_2 . Référence : Dell et al. (2021) avec la permission de www.leafly.com/news/science-tech/what-is-the-endocannabinoid-system

II Matériels et Méthodes

1 Approbation éthique

Le comité de protection et d'utilisation d'animaux de l'Université de Rouen a approuvé toutes les procédures expérimentales réalisées dans cette étude, selon la règle des 3R (Remplacer l'expérimentation animale si possible, et à défaut, Réduire le nombre d'animaux utilisés et Raffiner les procédures).

2 Culture *in vitro* et contrôles *in vivo*

Afin d'évaluer l'impact de l'activation de CB_2 au cours de la première vague de la spermatogenèse, des cultures *in vitro* sont effectuées à partir de tissus testiculaires prépubères. Les contrôles *in vivo* (témoins) ont été faits (Figure 6) en utilisant des testicules de souris (aux âges correspondants aux étapes de la spermatogénèse). En se référant aux différents stades de la spermatogénèse, des temps ont été sélectionnés car des stades

spécifiques des cellules germinales étaient présents.

3 Analyses morphologiques

De fines sections de tissus testiculaires et d'explants ont été montées sur des lame de Polysine et ont été colorées (i) avec l'hématoxyline éosine safran (HES) pour l'appréciation de la morphologie testiculaire et (ii) avec la réaction de Periodic acid-Schiff (PAS) pour la détection de l'acrosome, caractéristique des spermatozoïdes ronds.

4 Immunomarquages

L'immunofluorescence et l'immunohistochimie (Figure 7, Tableau 1) sont basés sur une réaction antigène-anticorps. Ces méthodes sont employées afin de détecter des antigènes ou des anticorps. Quand on souhaite repérer des antigènes, il est nécessaire d'avoir des anticorps spécifiques correspondant à la spécificité antigénique recherchée. Il s'agit de sérums polyclonaux préparés chez l'animal, d'immunoglobulines purifiées ou, plus souvent,

d'anticorps monoclonaux. Dans cette étude, suite à la fixation d'un anticorps sur l'antigène d'intérêt, il a été possible de le

visualiser avec le chromogène le 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) formant une coloration marron.

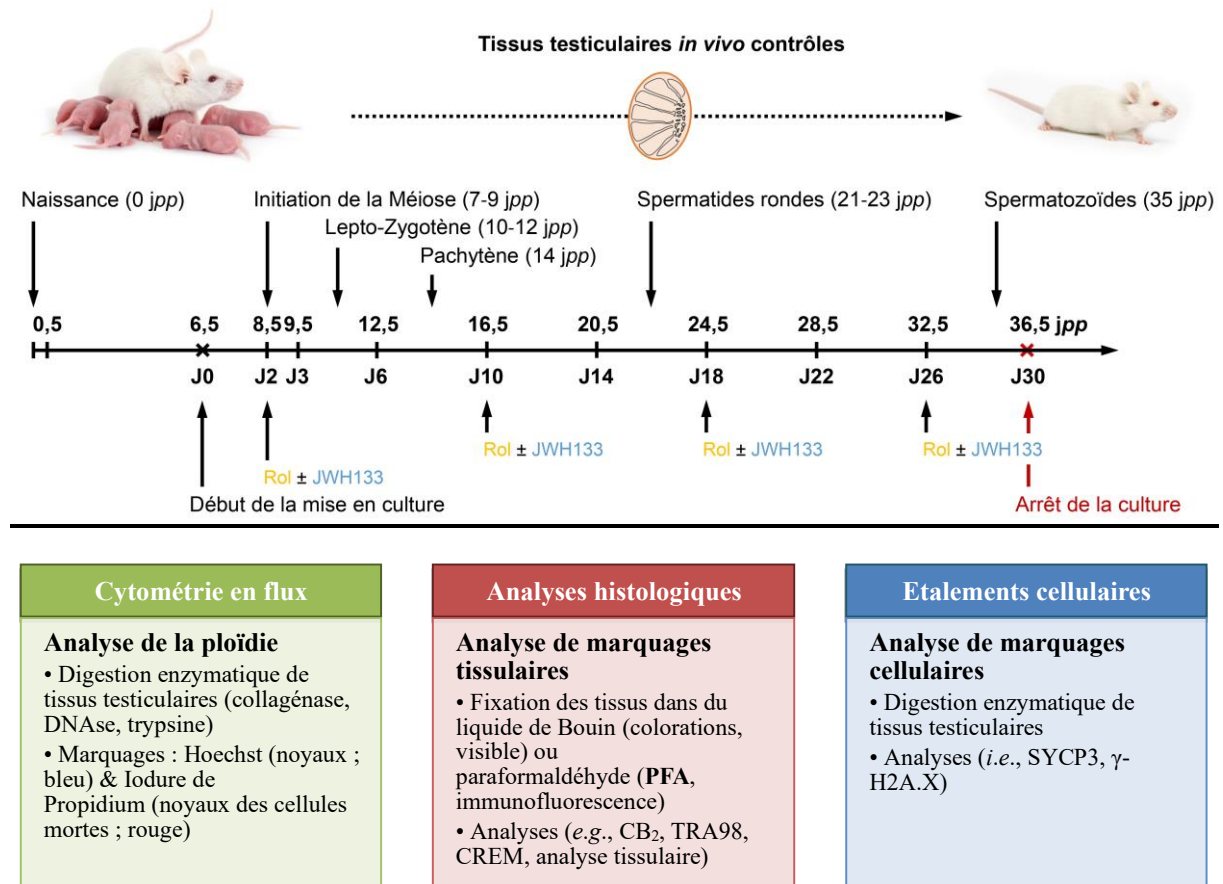


Figure 6: Organigramme de conception de l'étude. Des tissus prépubères sont mis en culture *in vitro*. D'autres sont utilisés comme contrôles *in vivo* aux âges correspondants. Diverses analyses tels que la cytométrie en flux pour étudier la ploïdie (le nombre de « n » des noyaux) par cytométrie en flux, des analyses histologiques des tissus et des étalements cellulaires sont effectuées afin de caractériser l'aspect du tissu testiculaire et des cellules. D'après Dumont et al., 2020.

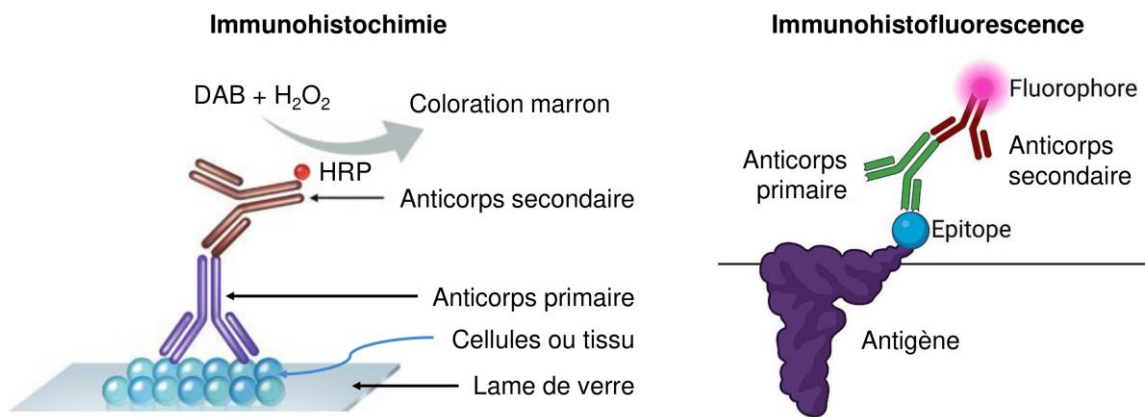


Figure 7 : Principe des techniques d'immunomarquage. Le principe de l'immunohistochimie repose sur la reconnaissance d'un antigène par un anticorps spécifique et la révélation de ce complexe antigène-anticorps par une réaction chimique grâce à une enzyme et son substrat. Un anticorps connu qui dirigé contre un antigène recherché est utilisé sur la préparation histologique. Une mise en évidence est ensuite effectuée sur la fixation éventuelle de l'anticorps par un chromogène (comme le DAB) responsable d'une couleur particulière (marron). De manière générale, l'enzyme est la Horse Radish Peroxidase (HRP) ou la phosphatase alcaline. Ainsi, l'immunohistochimie consiste à détecter directement dans les tissus le site de liaison d'un anticorps spécifique avec la protéine contre laquelle il est dirigé. Dans le cas de l'immunofluorescence, le principe reste le même. Les antigènes ou anticorps sont cependant détectés grâce à des anticorps couplés à un fluorochrome. Les deux techniques ont été employées dans cette étude. Références : d'après Kim S.W. et al. (2016) et <https://fr.wikipedia.org/wiki/Immunofluorescence>

Tableau 1 : Anticorps utilisés au cours de l'étude. Estimation de différents stades de différenciation des cellules germinales par immunomarquage des sections de tissus (gauche). Évaluation de l'expression de CB₂ dans les tubes séminifères par immunofluorescence (droite).

Immunohistochimie		Immunofluorescence	
Anticorps utilisés	Anticorps de rat <i>Anti-TRA98</i>	Anticorps de lapin <i>Anti-CREM</i>	Anticorps de lapin <i>Anti- CB₂</i>
Identification	Spermatogonie, Spermatocytes I Leptotène, Zygotène, Pachytène (stade précoce)	Spermatocyte Pachytène (stade tardif), Spermatide ronde	Présence de CB ₂

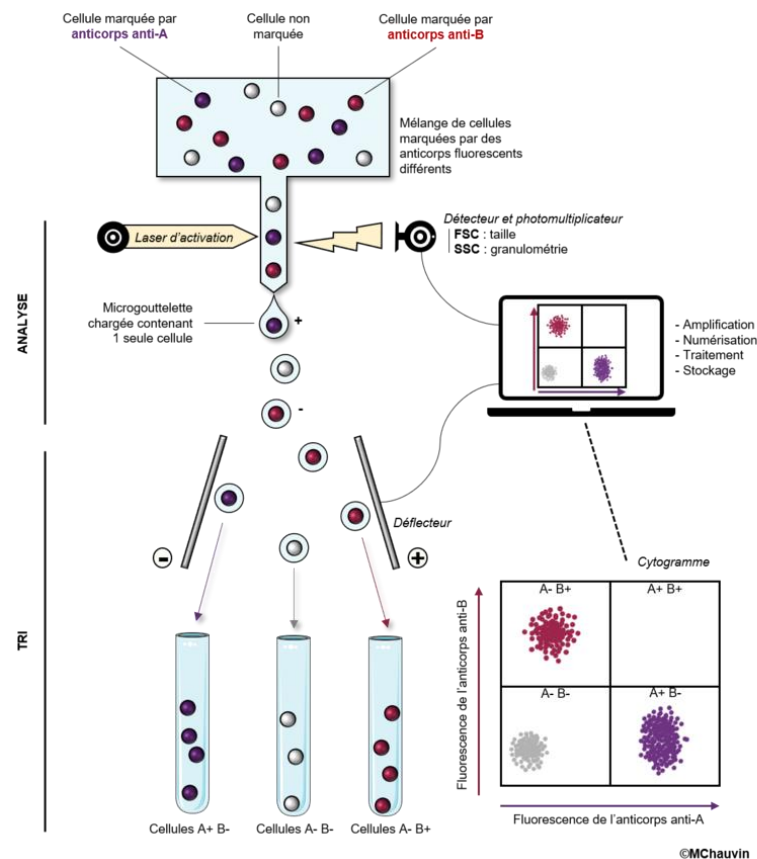


Figure 8 : Principe du tri cellulaire activé par fluorescence (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS). La cytométrie en flux est un processus technologique qui utilise un ou plusieurs lasers afin de faire une analyse sur des cellules individuelles. Elle permet entre autres d'étudier le cycle cellulaire, d'analyser la viabilité et la vitalité de cellules ainsi que l'apoptose sur une lignée cellulaire. Les applications de la cytométrie en flux concernent des domaines variés comme la biologie moléculaire et cellulaire, la cancérologie, l'immunologie, la pharmacologie. Référence : https://fr.wikipedia.org/wiki/Cytométrie_en_flux (Manon Chauvin).

5 Cytométrie en flux.

La technique de cytométrie en flux (Figure 8) permet une évaluation de la ploïdie des cellules en évaluant la quantité d'ADN dans chaque noyau : 4C : différents stades de spermatocyte I et spermatogonies G2 ; 2C : spermatogonies G1 et spermatocyte II ; 1C : spermatide allongée et spermatide ronde et 1C* : spermatozoïde et spermatide allongé.

6 Évaluation de l'étalement des cellules testiculaires.

Un marquage de la protéine 3 du complexe synaptonémal (SYCP3) (Figure 9) a été effectué afin d'identifier les éléments axiaux chromosomiques présents à la prophase I de la méiose. De même pour détecter les régions chromosomiques non synaptiques, le marquage de l'histone H2A.X phosphorylée (γ -H2A.X) a été effectué. L'ADN contenu dans le noyau des cellules a été marqué avec au DAPI.

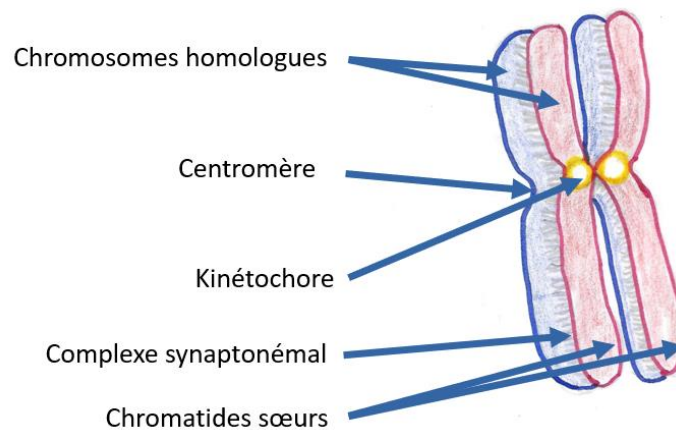


Figure 9 : Schéma présentant un complexe synaptonémal. Au début de la prophase I, les chromosomes homologues se réunissent pour former une synapse. Les chromosomes sont étroitement liés entre eux parfaitement alignés par un réseau protéique appelé complexe synaptonémal et par des protéines de cohés situées au centromère. D'après "OpenStax Anatomy and Physiology", Version 8.25 from the Textbook, 201.

III Résultats et Discussion

1 Une concentration de 1 μ M de JWH133 permet une meilleure différenciation in vitro des cellules germinales testiculaires prépubertaires

Une première série de cultures d'explants testiculaires de souris de 6,5 jours *post-partum* (jpp) a été réalisée afin d'évaluer l'impact d'une gamme de supplémentation en JWH133 (10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M). La concentration de 1 μ M de JWH133 a été trouvée comme étant celle qui réduit la zone nécrotique centrale à 30 jours (J30) et favorise un nombre plus élevé de cellules CREM-positives par zone de tissu sain. Ces données sont cohérentes avec d'autres études de la littérature scientifique qui ont évalué l'impact de JWH133 sur la culture de cellules isolées avec une concentration

optimale de 1 μ M.

2 CB₂ est exprimé dans les tissus testiculaires cultivés in vitro pendant l'initiation de la méiose de la première vague de la spermatogénèse

CB₂ est exprimé au niveau de la membrane plasmique des cellules intratubulaires dans un nombre réduit de tubes séminifères à 6,5 jpp (Figure 10 A₁-C₁). Les tubes séminifères avec une forte expression de CB₂ apparaissent à J3 (Figure 10 A₃-C₃). Le pourcentage de tubes séminifères avec une expression de CB₂ est plus élevé à J3 (13,8 \pm 1,28%) après 24 h de supplémentation avec JWH133 initiée à J2, confirmant une expression de CB₂ *in vitro*. Ces résultats sont en accord avec les observations faites par une autre équipe sur des cultures de cellules murines isolées obtenues à partir de tissus testiculaires de souris de 6,5 jpp et cultivées pendant 24 h.

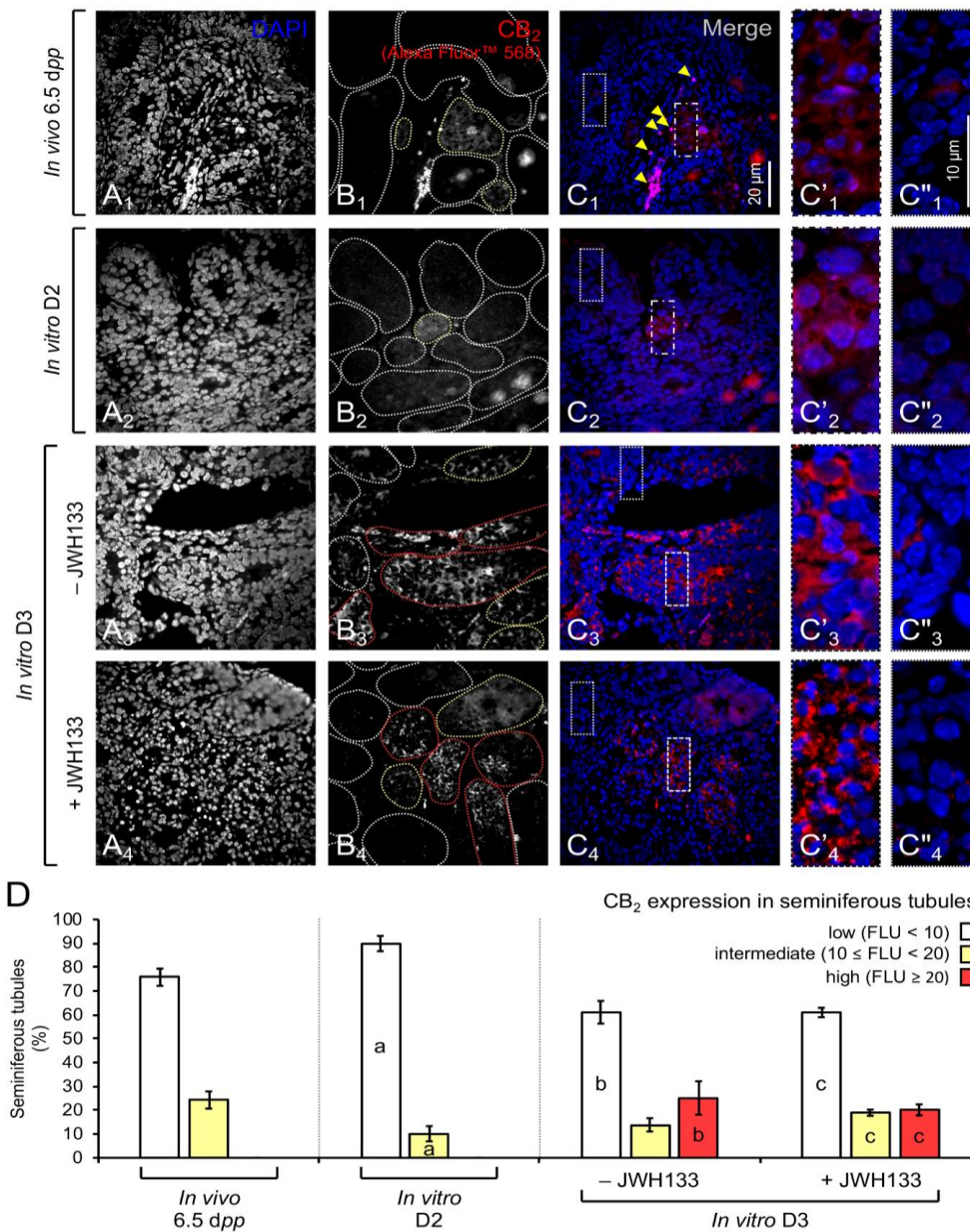


Figure 10 : Immunofluorescence de CB₂. La présence de CB₂ (signal rouge) a été évaluée dans des tissus testiculaires et des explants. L'ADN des noyaux est marqué au DAPI (signal bleu). Des images en fluorescence ont été obtenues pour des tissus testiculaires in vivo à 6,5 jpp (A₁, B₁ et C₁) et des explants testiculaires in vitro à J3 avec (A₄, B₄ et C₄) ou sans (A₃, B₃ et C₃) supplémentation en JWH133. Les tubes séminifères présentant un niveau d'expression de CB₂ faible (en blanc), intermédiaire (en jaune) et élevé (en rouge) sont délimités par des cercles en pointillés. D'après Dumont et al. (2020).

3 La ploïdie des cellules issues du tissu testiculaire est modifiée *in vitro* par la supplémentation en JWH133.

On peut observer une discrète entrée en méiose des spermatogonies pour les explants testiculaires cultivés *in vitro*. A la fin de la culture à J30, la proportion de cellules évaluées comme étant des cellules haploïdes post-méiotiques (représentant 1C* + 1C) obtenues après une supplémentation avec JWH133 ($12,2 \pm 1,61\%$) est plus élevée que sans supplémentation ($6,30 \pm 1,16\%$, $P = 0,0286$) (Figure 11).

4 La supplémentation en JWH133 permet une meilleure différenciation des cellules germinales testiculaires de testicules prépubères cultivés *in vitro*.

Le développement progressif des

cellules germinales à des moments clés de la spermatogenèse (Figure 12) a été évalué tout au long de (i) la culture *in vitro* (jour 2 [D2], J3, J6, J10, J18, et J30) couplée à (ii) des contrôles *in vivo* (8, 9, 12, 16, 25, et 36 *jpp*). Aucune formation de nécrose n'a été observée pour les tissus testiculaires témoins *in vivo*. Pour les cultures *in vitro*, une importante zone nécrotique a été détectée après environ une semaine de culture. Vers la fin de la culture, une réduction de la zone nécrotique est observée pour la condition utilisant une supplémentation de $1 \mu\text{M}$ de JWH133 ($27,5 \pm 1,07\%$) par rapport aux explants cultivés sans supplémentation ($45,8 \pm 2,83 \%$, $P = 0,0043$). De plus, lorsque l'ajout de JWH133 permet une augmentation du nombre de cellules CREM-positives (cellules germinales post-méiotiques).

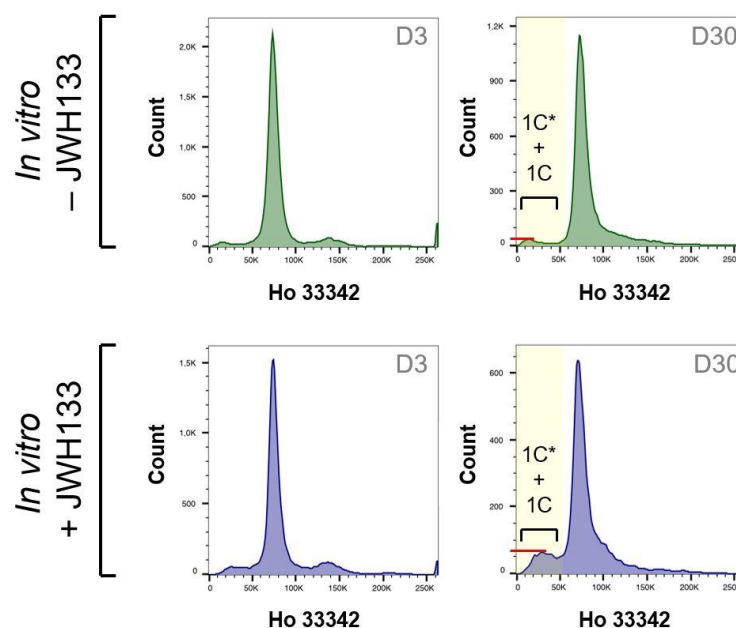


Figure 11 : Évaluation de la supplémentation en JWH133 sur des explants testiculaires au long d'une culture organotypique *in vitro* de 30 jours. Teneur en ADN des explants testiculaires *in vitro* avec ou sans supplémentation avec JWH133. C, quantité d'ADN (correspondant au nombre de chromosomes) ; Ho 33342, Hoechst 33342 (marquant l'ADN). D'après Dumont et al. (2020).

12

Article en accès libre sous licence Creative Commons (CCAL) : cet article est en téléchargement et diffusion libre sans but commercial ni modification et doit être cité comme mentionné en fin d'article ou sur le site du journal.

Free access article under Creative Commons licence: this article can be downloaded and shared without any commercial purpose and cannot be modified. It must be cited as mentioned at the end of the article or in the journal website.

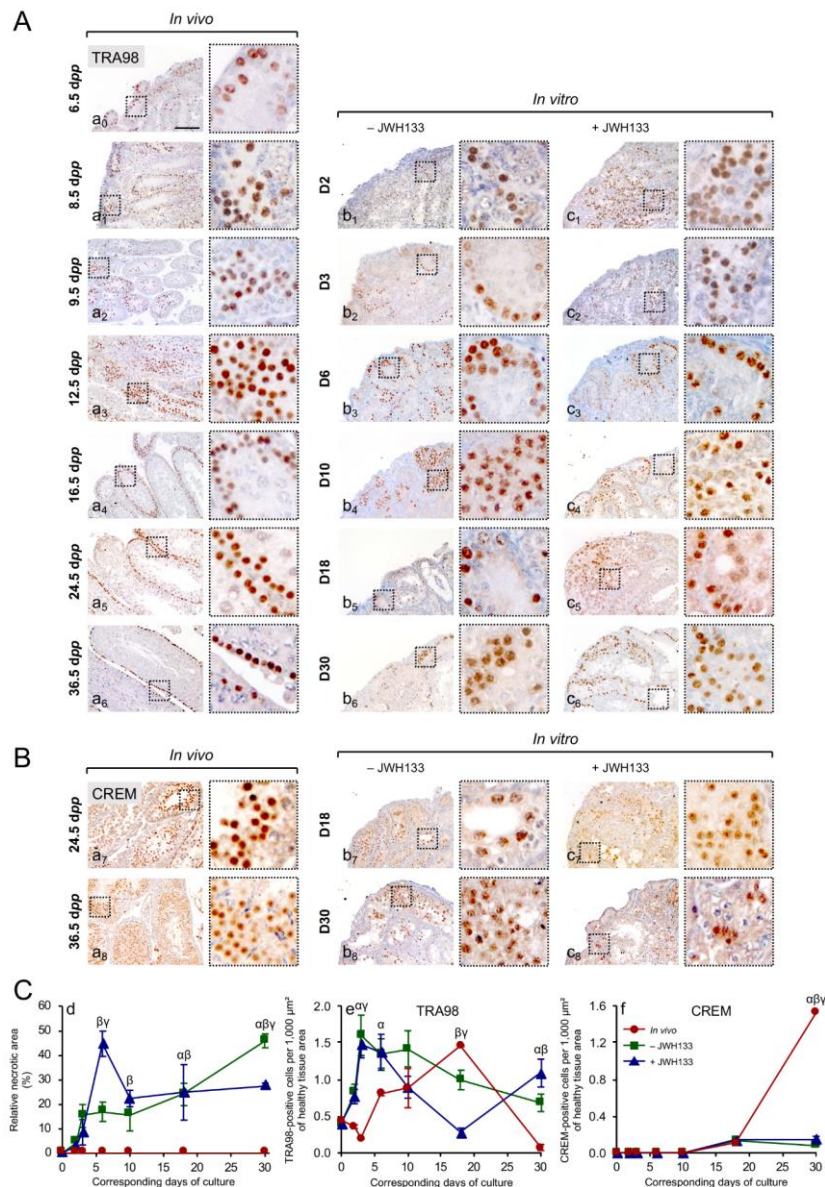


Figure 12 : Évaluation de la supplémentation en JWH133 sur des explants testiculaires de souris tout au long d'une culture d'organe in vitro de 30 jours. Analyse histologique de tissus testiculaires in vivo (a_{0-8}) et explants testiculaires obtenus par culture in vitro de 30 jours avec (+ JWH133 ; c_{1-8}) ou sans (- JWH133 ; b_{1-8}) la supplémentation en JWH133 à $1 \mu\text{M}$. Une évaluation de la densité des cellules germinales a été effectuée à l'aide du TRA98, notamment en début de culture (J2 ; b_1 et c_1 et J3 ; b_2 et c_2) et à l'aide du CREM en fin de culture (J18 ; b_7 et c_7 et J30 ; b_8 et c_8). Des testicules d'âges correspondants ont été utilisés comme contrôles in vivo. Les cellules positives ont été colorées en brun par le chromogène DAB et une contre-coloration bleue a été obtenue avec de l'hématoxyline. D'après Dumont et al. (2020).

13

Article en accès libre sous licence Creative Commons (CCAL) : cet article est en téléchargement et diffusion libre sans but commercial ni modification et doit être cité comme mentionné en fin d'article ou sur le site du journal.

Free access article under Creative Commons licence: this article can be downloaded and shared without any commercial purpose and cannot be modified. It must be cited as mentioned at the end of the article or in the journal website.

5 La culture organotypique maintient la progression de la méiose des cellules germinales.

En culture *in vivo*, l'entrée en méiose est corrélée à l'expression de la protéine SYCP3 du complexe synaptonémal qui est localisée le long de la chromatine condensée du spermatocyte I zygotène au pachytène. La protéine γ -H2A.X, présente

dans les cassures doubles brins de l'ADN, est légèrement visible des spermatogonies au spermatocyte I pachytène au niveau de la vésicule sexuelle (corps XY) (Figure 13). Une spermatogenèse complète a été obtenue *in vitro*, avec une augmentation du pourcentage de spermatocyte zygotènes après activation de CB₂ par 1 μ M de JWH133.

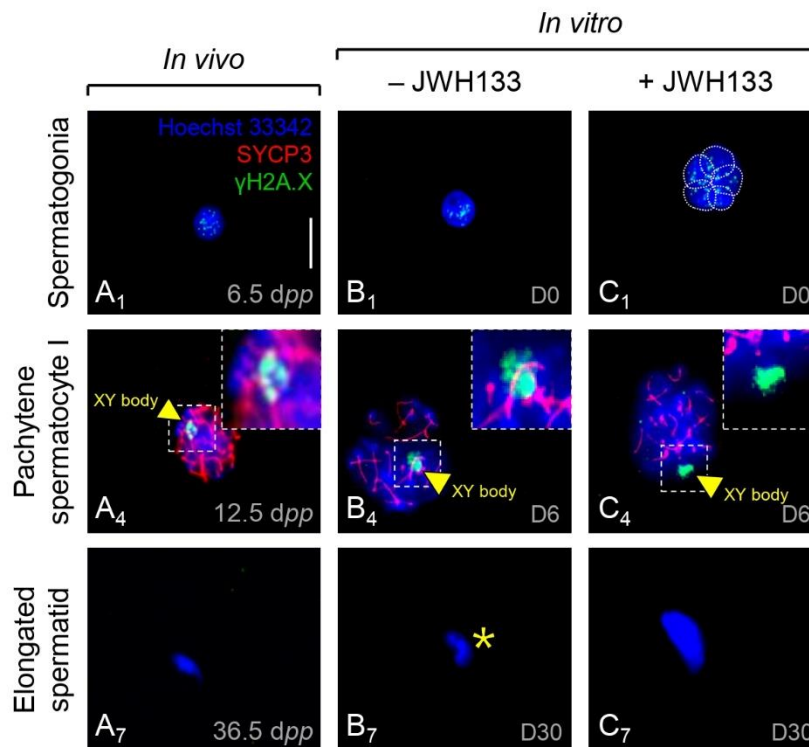


Figure 13 : Analyse en immunofluorescence de la progression de la spermatogenèse *in vivo* et *in vitro* de souris. Les noyaux étalés ont été doublement marqués avec le SYCP3 (signal rouge) et le γ -H2A.X (signal vert) et contre-colorés avec Hoechst 33342 (signal bleu). D'après Dumont et al. (2020).

IV Conclusion

Après 30 jours de culture *in vitro* en interface gaz-liquide :

i. un enrichissement des cellules germinales haploïdes a été détecté par cytométrie en flux ;

ii. une réduction de la zone nécrotique (engendrée par une hypoxie au centre de l'explant testiculaire) a été observée ;

iii. une augmentation de la densité des cellules germinales post-méiotiques a été observée.



Cette étude montre une spermatogénèse complète *in vitro* observée après 30 jours de culture organotypique d'explants tissulaires de souris prépubères. Cette étude définit le rôle majeur des endocannabinoïdes et du récepteur de cannabinoïdes de type 2 pour le développement des cellules germinales pendant la première vague spermatogène

chez la souris. La pertinence clinique potentielle de ces observations est que l'administration d'agonistes à base de cannabinoïdes pourrait stimuler la spermatogénèse *in vitro*.

Il a été montré que l'activation de CB₂ améliore *in vitro* l'entrée en méiose et la différenciation des spermatogonies, mimant ainsi la transition méiotique physiologique.

LEXIQUE :

Agoniste : Il s'agit d'une molécule qui se lie à un récepteur membranaire et l'active. Il imite souvent le messager naturel qui se lie habituellement au récepteur.

Anticorps : Protéine de défense produite par l'organisme en présence d'un antigène dont elle neutralise l'effet toxique. L'anticorps sera spécifique à un antigène donné pour lequel il reconnaîtra une partie spécifique appelée épitope ou déterminant antigénique. Cette spécificité antigène-anticorps est utilisée dans les techniques d'immunomarquage.

Apoptose : Processus physiologique de mort cellulaire programmée.

Cellules CREM-positives : Marquage spécifique obtenu à partir d'un anticorps détectant spécifiquement la protéine CREM : permet de faciliter la détection des cellules germinales post-méiotiques.

Culture *in vitro* / Culture *in vivo* : Le terme « *in vivo* » fait référence à une expérience qui utilise un organisme vivant entier, plutôt qu'un organisme mort. Les essais cliniques et l'expérimentation animale sont deux types de recherche. Les tests *in vivo* ont été privilégiés par rapport aux tests *in vitro* car ils sont mieux adaptés à l'observation des effets globaux quand il s'agit d'une expérience sur un sujet vivant. *In vitro* (du latin « sous verre ») : en milieu artificiel, en laboratoire.

Culture organotypique : C'est une méthode consistant à prélever un organe sur un organisme et à le cultiver tout en préservant la structure de l'organe et la plupart des interactions cellulaires.

Cytométrie : La mesure caractéristique des cellules.

Explant : Fragment de tissu mis en culture.

Fixation : Étape en histologie destinée à immobiliser les structures cellulaires et tissulaires, de façon à les représenter le plus vivant possible.

Gonadotoxicité : L'effet néfaste d'un traitement anticancer sur la fertilité est appelé "gonadotoxicité". Cette appellation est issue de la fusion des mots « gonade » (organes de reproduction) et « toxicité » (nocivité).

Hoechst 33342 : Marqueur fluorescent utilisé pour marquer l'ADN.





Jour post-partum (latin) (jpp) : Jour après l'accouchement. Équivalent en anglais *day post-partum (dpp)*.

Leptotène : Se dit du premier stade de la prophase (méiose I), où les chromosomes se présentent sous la forme de longs filaments grêles.

Pachytène : Troisième stade de la prophase de la première mitose réductionnelle, caractérisé par le raccourcissement et l'épaississement des chromosomes.

Paraformaldéhyde : Forme polymérique solide amorphe blanche de forme formaldéhyde. Le paraformaldéhyde est dépolymérisé en formaldéhyde. Celui-ci peut être utilisé en dentisterie comme fumigant, dans le domaine agricole comme fongicide, bactéricide et en culture cellulaire comme fixateur (ce qui est le cas dans cet article : il va servir à fixer les tissus pour éviter qu'ils ne pourrissent).

Ploïdie : Nombre de garnitures chromosomiques simples d'une cellule ou d'un individu, exprimé par le symbole C (comme dans cette article) ou N.

Prolifération : Fait proliférer (se multiplier en se reproduisant).

Solution de Bouin : Le liquide de Bouin est composé d'acide picrique, de formaldéhyde et d'acide acétique. Le liquide de Bouin sert à fixer des tissus.

Spermatide : Cellule sexuelle mâle dont dérive le spermatozoïde.

Spermatocyte : Cellule germinale mâle qui devient une spermatide, puis un spermatozoïde.

Spermatogenèse : La spermatogenèse est le processus lors duquel un gamète mâle (spermatozoïde) est produit. Un gamète mâle passe par plusieurs stades de développement : la spermatogonie, le spermatocyte de premier ordre, le spermatocyte de deuxième ordre, la spermatide et, pour finir, le spermatozoïde. On part donc d'une spermatogonie diploïde, contenant l'information génétique en entier, pour obtenir 4 spermatozoïdes haploïdes.

Spermatogonies : Cellules germinales directement en contact avec la membrane basale du tube séminifère qui donnent naissance à des spermatocytes par des mitoses.

Spermiogénèse : Processus de différenciation progressive des spermatides en spermatozoïdes.

Tissu sain : Un tissu est un regroupement de nombreuses cellules qui possèdent toutes les mêmes caractéristiques. Ensemble, elles assurent une fonction au sein de l'organe auquel elles appartiennent.

Zone nécrotique : C'est une zone au niveau de laquelle, on distingue une mort accidentelle, pathologique des cellules appelée nécrose suite à une agression (une anoxie tissulaire par exemple).

Zygotène : Deuxième stade de la prophase de la méiose I, marqué par l'appariement côte à côte des chromosomes homologues sur toute leur longueur.





Références :

- Dell DD, Stein DP. Exploring the Use of Medical Marijuana for Supportive Care of Oncology Patients. *J Adv Pract Oncol*. 2021 Mar;12(2):188-201.
- Du Plessis SS, Agarwal A, Syriac A. Marijuana, phytocannabinoids, the endocannabinoid system, and male fertility. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(11):1575-1588. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0553-8>
- Dumont L, Arkoun B, Jumeau F, *et al*. Assessment of the optimal vitrification protocol for pre-pubertal mice testes leading to successful in vitro production of flagellated spermatozoa. *Andrology*. 2015;3(3):611-625. <https://doi.org/10.1111/andr.12042>
- Dumont L, Oblette A, Rondanino C, *et al*. Vitamin A prevents round spermatid nuclear damage and promotes the production of motile sperm during in vitro maturation of vitrified pre-pubertal mouse testicular tissue. *Mol Hum Reprod*. 2016;22(12):819-832. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw063>
- Dumont L. *Effets de la congélation et de la vitrification sur le tissu testiculaire pré-pubère murin : impact sur la différenciation in vitro des spermatogonies souches*, Thèse de doctorat en Biologie, sous la direction de Nathalie Rives, Rouen, École doctorale Normande de biologie intégrative, santé, environnement (Mont-Saint-Aignan, Seine-Maritime), 2016, 355 p.
- Dumont L, Rives-Feraille A, Delessard M, *et al*. Activation of the cannabinoid receptor type 2 by the agonist JWH133 promotes the first wave of in vitro spermatogenesis. *Andrology*. 2021 Mar;9(2):673-688.
- Grimaldi P, Di Giacomo D, Geremia R. The endocannabinoid system and spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:192. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00192>
- Grimaldi P, Orlando P, Di Siena S, *et al*. The endocannabinoid system and pivotal role of the CB2 receptor in mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(27):11131-11136. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812789106>
- Hou M, Andersson M, Eksborg S, Söder O, Jahnukainen K. Xenotransplantation of testicular tissue into nude mice can be used for detecting leukemic cell contamination. *Hum Reprod*. 2007;22(7):1899-1906. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem085>
- Jahnukainen K, Mitchell RT, Stukenborg J-B. Testicular function and fertility preservation after treatment for haematological cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2015;22(3):217-223. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000156>
- Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J Pathol Transl Med*. 2016 Nov;50(6):411-418. <https://doi.org/10.4132/jptm.2016.08.08>
- Li X, Hua T, Vemuri K, *et al*. Crystal structure of the human cannabinoid receptor CB2. *Cell*. 2019;176(3):459-467.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.011>
- Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, *et al*. In vitro production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat Commun*. 2011;2:472. <https://doi.org/10.1038/ncomm1478>





Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002;66(2–3):173-192. <https://doi.org/10.1054/plef.2001.0356>

Wyns C, Curaba M, Vanabelle B, van Langendonck A, Donnez J. Options for fertility preservation in prepubertal boys. *Hum Reprod Update*. 2010;16(3):312-328. <https://doi.org/10.1093/humup/d/dmp054>

Zarandi NP, Galdon G, Kogan S, Atala A, Sadri-Ardekani H. Cryostorage of immature and mature human testis tissue to preserve spermatogonial stem cells (SSCs): a systematic review of current experiences toward clinical applications. *Stem Cells Cloning*. 2018;11:23-38. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S137873>

Ont participé au travail d'écriture de cet article, en collaboration le Dr. Ludovic Dumont, Ingénieur de Recherche (IGR, PhD) en Biologie de la Reproduction (par ordre alphabétique) : Bavart Noah, Boulet Ilona, Claux-Hardy Sarah, Deconinck Timéa, Destrebecq Louise, Genot Baptiste, Gramont Paul, Lebail Ninon, Maurice Flora, Minos Ludmilla, Pomorski Bastien, Rizzo Camille, Veyt Cloé.

Comment citer cet article : Ludovic Dumont et la 1^{ère}-Terminale du lycée Groupe Scolaire Sévigné (Compiègne, FR), *L'activation du récepteur aux cannabinoïdes de type 2 favorise la production de spermatozoïdes in vitro*, Journal DECODER, 2024-06-30.

