MODIFICATION DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE DES CELLULES DU TESTICULE PAR UN ACTIVATEUR DU METABOLISME

Faure Mélanie[1], Alves Sabine[1], Guibert Edith[1], Michailidis Georgios[2], Anastasiadou Maria[2], Brillard Jean-Pierre[3], Froment Pascal[1]

1 INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et du Comportement, F-37380 NOUZILLY
2 Laboratory of Physiology of Reproduction of Farm Animals, Department of Animal Production, School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, Greece;
3 FERTIL'AVI, 10, rue du 8 Mai F-37360- Rouziers de Touraine

pfroment@tours.inra.fr

RÉSUMÉ

La metformine possède des propriétés régulant le métabolisme énergétique, des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires chez certains mammifères et elle peut mimer la restriction alimentaire. Dans le but d'améliorer nos connaissances sur la voie de signalisation qu'elle active, nous avons regardé l'activité de cette molécule sur le testicule de poulet ; et plus particulièrement sur les cellules de Sertoli qui protègent les cellules germinales. Celles-ci ont des aptitudes immunitaires (sécrétion de facteurs immunologiques), de phagocytose et constituent également la barrière de protection majeure du testicule limitant ainsi les infections testiculaires et les atteintes aux cellules germinales.

La stimulation des cellules de Sertoli de poulet *in vitro* par du LPS (le LipoPolySaccharide est utilisé pour mimer une infection bactérienne), a été réalisée selon une cinétique (0, 6, 12, 24, 48h). Suite à cette stimulation, l'expression et la production de certaines interleukines sont augmentés (IL-1β, IL-6, IL-8), ainsi que l'expression de certains récepteurs du système immunitaire (Tolls like receptors, TLRs). Notre principal objectif est de connaitre l'effet de la metformine seule ou additionnée a du LPS sur l'activité protectrice des cellules de Sertoli. La metformine seule a induit en 12h une augmentation d'expression de TLRs, en particulier les TLR1-2 ; 2-1 et de certaines cytokines (molécules sécrétées lorsque le système immunitaire est activé), l'IL-1β, IL-6, IL-8 et IFN-γ. La stimulation par du LPS de cellules prétraitées par de la metformine a accru l'expression de l'IL-1β suggérant un effet synergique de la metformine lors d'une infection.

Nous pouvons conclure que les cellules de Sertoli de poulet possèdent un potentiel immunitaire important et que leurs réponses suite à un stimulus de type bactérien est plus lente que celles des cellules immunitaires circulantes. De plus, la metformine permet de pré-stimuler la fonction immunitaire des cellules de Sertoli de poulet afin de mieux répondre lors d'une infection bactérienne.

ABSTRACT

Inflammatory response of testis cells amended in the presence of metformin

Metformin possesses properties regulating energy metabolism, anti-oxidant and anti-inflammatory in some mammals and can mimic dietary restriction. Our purpose was to better understand the signalling pathway activated by metformin. We have shown its activity on chicken testicular cells and more particularly on the protective cells of germ cells, called Sertoli cells. These cells present immune properties such as immune factors secretion, phagocytosis and constitute also the blood testicular barrier which limit damage of germ cells.

The stimulation of Sertoli cells cultured *in vitro* with LPS (lipopolysaccharide was used to mimic a bacterial infection), was conducted using a kinetic of stimulation (0, 6, 12, 24, 48h). Following LPS stimulation, the expression and production of some interleukins were increased (IL-1β, IL-6, IL-8), as well as receptors of the immune system (Tolls like receptors, TLR). Our aim is to know metformin effect or added to LPS on the protective activity of Sertoli cells. After12h of metformin stimulation, an increase in expression of TLRs was observed, in particular TLR1-2, 2-1 and some cytokines (secreted when the immune system is activated), IL-1β, IL-6, IL-8 and IFN-γ. The stimulation by the LPS of cells pre-treated by metformin has presented an increase in the expression of IL-1β, suggesting an inflammatory effect of metformin.

We can conclude that chicken Sertoli cells possess the set of immune system, but their response following a bacterial infection was slower than the circulating immune cells. Metformin will induce a better response of Sertoli cells in presence of bacterial infection.

INTRODUCTION

Chez les oiseaux comme chez les mammifères, la nutrition et le métabolisme énergétique influencent fortement la fonction de reproduction (Hocking et *al.,* 1987). Dans plusieurs espèces (ex : ovins, rongeurs, volailles), une sous-nutrition sévère appliquée avant la maturité sexuelle induit de manière durable une diminution de la taille testiculaire et une altération de la spermatogenèse. Dans les espèces d'intérêt agronomique sélectionnées pour la production de viande, une croissance rapide des individus sélectionnés est presque toujours accompagnée d'une altération des capacités reproductrices dans les deux sexes. Le cas des souches de poulets « chair » est typique (l'élevage de volailles est la 2ème source de production de viandes sur le marché mondiale) : l'alourdissement de celle-ci est corrélé à la diminution de la capacité reproductrice (Romero-Sanchez et *al.,* 2008). Cette altération est identifiée par l'apparition d'une puberté précoce ainsi que d'une chute rapide du développement testiculaire et de la production spermatique. Le maintien d'une partie des performances de reproduction ne peut être assuré qu'à condition d'appliquer (depuis le stade impubère) un rationnement alimentaire aux animaux.

Nous nous sommes intéressés à la metformine, un agent pharmaceutique, qui est régulièrement utilisée dans le traitement de pathologies tel que des désordres métaboliques. Cette molécule présente des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoire chez certains mammifères et anti-oncogénique. Elle est employée dans les cas de maladies liées à une résistance à l'insuline, mais également chez la femme lorsqu'une baisse de fertilité est associée à une insulino-résistance (Froment et Touraine, 2006). Cette molécule hydrophile est absorbée relativement lentement (période pouvant durée jusqu'à 6 heures) ce qui permet une normalisation du niveau de glucose dans le sang pour les cas de diabète. L'administration de metformine à des animaux en bonne santé n'affecte pas leur glycémie.

La metformine va agir sur le métabolisme en bloquant la fabrication d'énergie dans la cellule (via la mitochondrie) et en activant une protéine, l'AMPK (AMP-activated proteine Kinase) (Ducommun et *al.,* 2014). En agissant sur la mitochondrie, cette molécule entraine une évolution du ratio AMP/ATP provoquant ainsi une activation indirecte de l'AMPK (Foretz et *al.,* 2006).

Deux types de cellules sont retrouvés au sein des tubes séminifères, siège de la production de spermatozoïdes. Les cellules de Sertoli présentent de nombreuses capacités, elles nourrissent les cellules germinales et les protègent. Il est établi que le nombre de cellules de Sertoli dans le testicule est corrélé avec le poids testiculaire et la production de spermatozoïdes, ce qui leur confère un rôle de support physique pour les cellules germinales (Petersen et *al.,* 2006). Elles constituent également la barrière hémato-testiculaire et présentent une activité au sein du système immunitaire puisqu'elles sont considérées comme de macrophages-like (Michailidis et *al.,* 2014). Actuellement il y a peu d'information concernant l'effet de la metformine sur la spermatogenèse. Néanmoins des études ont montrés l'action de la metformine sur les cellules de granulosa, la stéroïdogenèse et la maturation ovocytaire (Tosca et *al.,* 2007).

Notre principal objectif est donc de connaitre l'effet de la metformine seule ou additionnée a du LPS (produit par les bactéries de type gram négatif) sur l'activité de protection des cellules de Sertoli. A terme, l'étude doit permettre de s'assurer qu'un traitement mimétique de la restriction alimentaire, (par exemple un traitement durant la période pré-pubère avec une molécule active naturelle, d'activités similaires à la metformine) pourrait retarder l'apparition de la puberté sans altérer la capacité immunitaire des cellules de Sertoli et donc ne pas entrainer un effet délétère sur la fonction de spermatogenèse.

1. MATERIELS ET METHODES

Dans notre étude les cultures primaires de cellules testiculaires pré-pubères (âgés de 4 à 6 semaines) ont été réalisées à partir de poulets de « chair », appartenant à la souche Ross.

1.1 Culture primaire de cellules de Sertoli

L'approche méthodologique est basée sur la culture de cellules testiculaires ; plus précisément de cellules de Sertoli de poulets (Guibert et *al.,* 2009). Les cultures de cellules de Sertoli sont réalisées dans du DMEM/F12 additionné de 5% sérum et cultivées à 37°C en atmosphère à 5% CO2. Après 24 heures le milieu de culture est remplacé par du DMEM/F12 sans sérum. Des cinétiques de stimulation sont réalisées à 3, 6, 12, 24 et 48 heures, le milieu de culture est collecté à 12, 24 et 48 heures. Les stimulations sont effectuées soit avec du LPS à 1µg/ml, soit avec de la metformine à 5mM (Figure 1A) ou les deux substances additionnées (Figure 1B). La condition contrôle comporte uniquement du milieu de culture.

1.2 RT-PCR

L'analyse quantitative de l'expression des gènes du système immunitaire (TLR et les cytokines) dans les cellules de Sertoli a été réalisée par PCR en temps réel, LightCycler (Roche Molecular Biochemicals). La PCR a été effectuée en utilisant le kit qPCR KAPA SYBR FAST (KapaBiosystems) et a été réalisé selon : Michailidis et *al.,* 2010 et Michailidis et *al.,* 2014. Les niveaux d'expressions des gènes ont été quantifiés en utilisant l'actine pour la normalisation de l'ADNc. Les

paramètres de cyclage sont les suivants: incubation à 95 ° C pendant 3 min, suivie de 45 cycles d'incubation à 95 ° C pendant 10 s, 56 ° C pendant 8 s, 72 ° C pendant 8 s suivies d'une analyse de courbe de fusion de 65 à 95 ° C. Toutes les réactions ont été réalisées six fois. La quantification a été réalisée en utilisant le logiciel d'analyse LightCycler480 (Roche). Les gènes dont l'expression relative a été analysée appartiennent aux familles des TLR (TLR1-1 ; TLR1-2 ; TLR 2-1 ; TLR2-2 ; TLR3 ; TLR4 ; TLR5 ; TLR7 ; TLR15 ; TLR21) et des cytokines (IL-1B ; IL-6 ; IL-8 ; IL-12 ; IL-15 ; IL-17 ; IL-18 ; IFN-y). Les données de PCR en temps réel ont été analysées en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Les changements dans la transcription de gènes ont été exprimés en valeurs relatives aux cellules stimulées par rapport à t=0 h (contrôle).

1.3 Dosage

Le milieu de culture prélevé à 12, 24 et 48 heures a été utilisé pour la réalisation des dosages. La concentration de l'interleukine 1β (IL-1β) a été réalisée en utilisant une interleukine 1β de poulet ELISA Kit (CSB-E11230Ch, Cusabio®), de même pour l'interféron-γ (IFN-γ) (CSB-E08550Ch, Cusabio®) et le kit ELISA pour mesurer l'interleukine 6 (IL-6) ELISA kit (CSB-E08549Ch, Cusabio®). Chaque dosage est réalisé en suivant les recommandations du fabricant. Toutes les normes et les échantillons ont été dosés en double. Les valeurs pour chaque état sont la moyenne ± SEM de trois différentes préparations de cellules de Sertoli immatures.

1.4 Mesure de l'activité luciférase

Les cellules de Sertoli de poulet ont été infectées pour exprimer un gène rapporteur (la luciférase) sous le contrôle d'un promoteur sensible à l'activité de NF-κB (luciférase, Cignal Lenti Reporter, SA bioscience, Quiagen, Paris, France). Après 72 heures d'infection, les cellules de Sertoli ont été traitées avec du LPS, de la metformine, ou les deux. L'expression et l'activité de la luciférase est mesurée au luminomètre après avoir incubées les cellules avec un substrat (Promega, Luciferase assay Kit). L'activité de la luciférase est ainsi quantifiée par la mesure de la lumière produite (Luminoskan Ascent Microplate, Luminometer, Thermo Scientific, Pittsburg, PA, USA). La quantification est ensuite normalisée par le nombre de cellules comptées par puits. L'expérience est réalisée pour chaque condition à 4 reprises.

1.5 Analyses Statistiques

L'évaluation des effets possibles engendrés par les cinétiques de stimulations sur l'expression des cytokines et des TLR a été faite par une analyse ANOVA à un facteur. La même analyse est réalisée pour les dosages de cytokines sécrétées dans le milieu de culture, et pour le rapporteur NF-κB. On considère significatif *p<0,05,** p<0,01, ***p<0,001.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Profilage transcriptionnel des cytokines

L'expression des cytokines par les cellules de Sertoli a été déterminée par RT-PCR. Les cytokines sont de petites protéines (glycoprotéines) qui interviennent dans la signalisation cellulaire en réponse à une inflammation. Elles ont pour rôle d'activer les cellules immunitaires et peuvent présenter une activité pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. L'analyse de l'expression a révélé que 8 cytokines (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL 17, IL-18 et IFN-γ), sont exprimées dans les cellules de Sertoli de poulet (Michailidis et *al.,* 2014). Les cinétiques de stimulation des cellules de Sertoli que ce soit avec du LPS seul, avec de la metformine seule ou lorsque les deux substances sont additionnées permettent de mettre en évidence que l'expression de l'IL-6 est significativement augmenté dans les trois conditions suite à 24 heures de stimulation. La même réponse est observée pour l'IL-1β et l'IL-8 dès 6 heures de stimulation. Dans le cas où l'on stimule les cellules avec du LPS seul, l'expression de l'IFN-γ est significativement diminué suite à 6 heures de stimulation. La metformine seule ou les deux substances additionnées augmentent l'expression de l'IFN-γ suite à 6 heures de stimulation. Les cellules de Sertoli répondent a une stimulation avec du LPS ou de la metformine ou les deux en modulant l'expression de certaines cytokines, notamment des cytokines pro-inflammatoires.

2.2 Sécrétion de cytokines

Le dosage des cytokines produites et sécrétées par les cellules de Sertoli a été effectué dans le milieu de culture pour la condition LPS seul et LPS additionné de metformine uniquement. Le dosage du milieu de culture révèle et confirme que la régulation à la hausse de l'ARNm de l'IL-1β conduit à une augmentation de la production de protéines et de sa sécrétion dans le milieu de culture (Figure 2A). Ce résultat suggère que la stimulation observée au niveau de l'ARNm s'accompagnerait d'une augmentation de la sécrétion de protéines, même si les cellules de Sertoli (préparées sur des poulets âgés de maximum 6 semaines) ne sont pas pleinement différenciées. Cependant il apparait que l'on ne confirme pas au niveau de la sécrétion protéique l'induction de l'IL-6 (Figure 2B) et de l'IFN-γ (Figure 2C) observée au niveau ARNm. Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de pouvoir affirmer que les cellules de Sertoli sont bien capables de produire et de secréter des cytokines en réponse à une stimulation uniquement avec de la metformine.

2.3 Profilage transcriptionnel des TLR

Les TLR sont des protéines transmembranaires exprimées en surface cellulaires ou à localisations intracellulaires. Ces récepteurs sont présentés par les cellules du système immunitaire et permettent la reconnaissance de molécules microbiennes ou virales. L'expression de TLR par les cellules de Sertoli a été déterminée par RT-PCR. L'analyse de l'expression a révélé que les 10 membres de la famille TLRs, à savoir TLR1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 3, 4, 5, 7, 15 et 21, sont exprimées dans les cellules de Sertoli de poulet (Michailidis et *al.,* 2014). Les cinétiques de stimulation des cellules de Sertoli que ce soit avec du LPS seul, avec de la metformine seule ou lorsque les deux substances sont additionnées, ont mis en évidence que l'expression du TLR 2-1 n'est pas changé suite à l'ajout de LPS dans le milieu. En revanche cette expression est significativement augmentée dans les deux autres conditions suite à 24 heures de stimulation. Pour le TLR-7, 24 heures de stimulation avec du LPS induisent une augmentation de l'expression du récepteur contrairement aux deux autres conditions qui induisent une diminution significative d'expression du TLR-7. Une stimulation des cellules de Sertoli avec de la metformine seule peut donc induire une augmentation ou une diminution d'expression de certains TLR. Dans le cas où l'on stimule les cellules avec du LPS seul, l'expression du TLR-4 est significativement augmenté suite à 24 heures de stimulation. La metformine seule n'a aucun effet sur l'expression du TLR-4. Enfin les deux substances additionnées diminuent l'expression du TLR-4 suite à 12 heures de stimulation. Le TLR-4 est le récepteur qui perçoit majoritairement les signaux de type microbiens (O'Neill et *al.,* 2013 et Wu et *al.,*.2008).

2.4 Activité de NFκB-luciferase

La fixation du ligand à son récepteur (TLR-4), conduit à une activation de la voie de signalisation NF-κB. NF-κB est un facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire. NF-κB est transloqué au noyau et conduit à l'activation de la transcription génique (O'Neill et *al.,* 2013 et Wu et *al.,* 2008). L'expression relative de NF-κB par les cellules de Sertoli est rapportée par l'activité de la luciférase. L'analyse de l'expression relative a révélé que les deux substances additionnées (LPS + metformine) induisent une augmentation significative de l'expression relative du facteur de transcription NF-κB après 24 heures de stimulation. L'addition des deux substances induit une augmentation significativement plus importante que celle induite par le LPS seul. De plus, il apparait que la metformine seule n'est pas capable de déclencher une activation de la voie de signalisation de NF-κB ; ce qui semble correspondre aux résultats mis en évidence précédemment concernant l'effet de la metformine seule sur l'expression du TLR-4.

CONCLUSION

En conclusion ces résultats suggèrent que la metformine peut jouer un rôle activateur de la fonction inflammatoire testiculaire chez le poulet. Nous avons identifié une action de cette molécule sur l'expression et la sécrétion de certaines cytokines pro-inflammatoires et également sur l'expression de certains TLR par les cellules de Sertoli *in vitro*. De plus la metformine induit une augmentation de l'activation de la voie de signalisation NF-κB généré par le LPS. Dans le futur, il serait nécessaire de confirmer l'hypothèse de l'induction du système immunitaire des cellules de Sertoli par l'analyse d'un processus biologique. Il serait intéressant de mesurer l'activité phagocytaire induite par la metformine ou les deux substances additionnées afin de la comparer à celle induite par le LPS seul. Pour terminer au mieux ce travail il serait nécessaire d'observer la réaction (réponse inflammatoire) des cellules de Sertoli en fonction des niveaux de restriction alimentaire imposés aux animaux afin de connaitre l'impact de cette réponse sur la croissance du testicule et sur la spermatogenèse (notamment en termes d'apport nutritif aux cellules germinales et d'impact sur la qualité des cellules germinales).

REMERCIEMENTS

Nous remercions Frédérique Mercerand, Patrice Gannier et les animaliers de l'unité expérimentale PEAT pour leur aide technique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

2. Ducommun S et al., 2014. Am J Physiol Endocrinol Metab (306) 688-696.
3. Foretz M et al., 2006. Medcine/Siences (22), 381-8.
4. Froment P et al., 2006. PPAR Research, 1-8.
5. Guibert E et al., 2011. Poultry Science (90), 1276-1286.
6. Hocking P M., 1987. Proceedings of the Nutrition Society (46), 217-225.
7. Michailidis G et al., 2010. Animal Reproduction Science (122), 294–302.
8. Michailidis G et al., 2014. Reproduction (148), 259-270.
9. O'Neill L A J et al., 2013. Nature Review Immunology (13) 453-460.
10. Petersen C et al., 2006. Horm Res (66), 153-161.

11. Romero-Sanchez H et al., 2008. Poultry Science (87), 805-811.
12. Tosca L et al., 2006. Journal of Endocrinology (190), 85-97.
13. Wu H et al., 2008. Endocrinology, (149), 4402-4412.

Figure 1. Protocole de Stimulation
A) Protocole de stimulation des cellules de Sertoli en culture soit avec du LPS soit de la metformine.
B) Protocole de stimulation des cellules de Sertoli avec les deux substances additionnées.

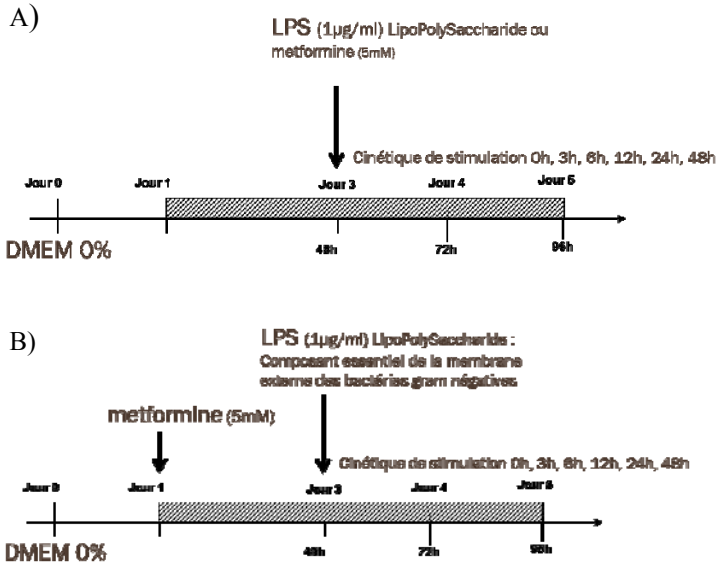
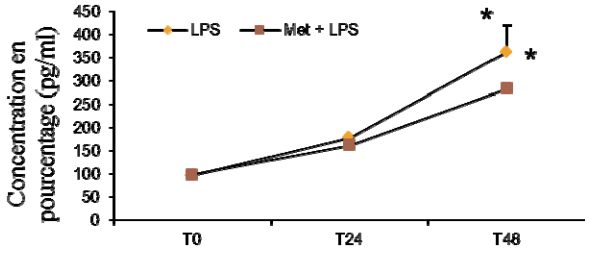
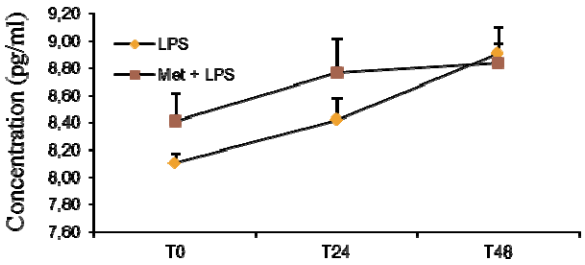


Figure 2. Evaluation de la sécrétion de cytokine dans le milieu de culture
A) Concentration de l'IL-1β, B) IL-6, C) et IFN-γ dans le milieu de culture après différentes durées de stimulation des cellules de Sertoli avec du LPS seul ou de la metformine additionnée de LPS, n=3.

A) IL-1β



B) IL-6



C) IFN-γ

