

EFFETS DU LINDANE SUR LE MOUVEMENT FLEGELLAIRE DES SPERMATOZOÏDES DE RAT

H. BERREBBAH*, M. R. DJEBAR* & C. JEULIN**

* Institut des Sciences de la Nature, Université de Annaba, BP:12, 23000, Annaba; Algérie.

** Centre Hospitalo-Universitaire de Kremlin Bicêtre, Paris, France.

Résumé

L'effet d'un insecticide organochloré, le lindane (δ hexachlorocyclohexane), est étudié sur le mouvement flagellaire des spermatozoïdes de rat. Les résultats obtenus montrent qu'à la concentration de $1,9 \times 10^{-4}$ M, le lindane perturbe le mouvement flagellaire et à la concentration de $3,2 \times 10^{-4}$ M ce mouvement est complètement inhibé. De plus, le lindane induit l'apparition d'une courbure statique importante à la base de la tête du spermatozoïde et il augmente sensiblement l'amplitude flagellaire. Les mécanismes d'initiation et de régulation du battement flagellaire sont actuellement à l'étude.

Mots clés: Mouvement; spermatozoïdes; lindane.

Abstract

The effect of an organic chlorine pesticide lindane (δ hexachlorocyclohexane), on flagellar movements of rat spermatozoa was studied. At the dose of $1,9 \times 10^{-4}$ M, lindane was found to considerably disturb the flagellar movement, and at the dose of $3,2 \times 10^{-4}$ M, it inhibit it completely. It was also demonstrated, that the pesticide provoked a marked static curvature at the level of spermatozoa heads, and an increase in the mechanism(s) of initiation and regulation of the flagellar movement are still under investigation.

Keywords: Movement; spermatozoa; lindane.

Introduction

Chez les organismes supérieurs, les cils ont pour principale fonction le déplacement d'un fluide à la surface de la cellule, ou alors ils servent d'éléments locomoteurs permettant de propulser une cellule à travers un fluide. Chez les Mammifères, les cils recouvrant le tractus respiratoire servent à drainer toutes les particules et cellules mortes pouvant gêner la respiration, vers les bronches grâce au transport mucociliaire.

Les cils et flagelles sont également impliqués dans la fonction de fécondation chez les animaux et chez les végétaux inférieurs. C'est grâce à leur flagelle que les spermatozoïdes parviennent à l'ovule et chez les vertébrés, ce sont les cils du tractus génital qui sont à l'origine de la migration des ovocytes le long de l'oviducte. Il est clair, que toute perturbation du mouvement de ces cils et flagelles, pourrait avoir des conséquences néfastes pour sur fonctions essentielles des êtres vivants (1, 2).

La plupart des exemples qui ont permis de mieux comprendre la fonction ciliaire et flagellaire, entre autre sa régulation, ont été réalisés sur des protistes ciliés ou flagellés. Les protistes ciliés tels que *Chlamydomonas* (3), *Dunaliella bioculata* (4) ou *Tetrahymena pyriformis* (5), constituent d'excellents modèles pour l'étude de molécules xénobiotiques en particulier de polluants de l'environnement.

Chez *Dunaliella bioculata*, le lindane est cilio-inhibiteur (6) et la toxicité de cette molécule s'étend à toutes les classes du règne animal (7). Chez les Mammifères, le lindane touche essentiellement le foie et serait promoteur de cancers hépatiques (8), le lindane induit une foetotoxicité chez la souris. Les écosystèmes aqueux et marin sont très perturbés par une exposition au lindane (9). Le lindane interfère avec le développement et la reproduction de *C. riparius*. Chez les végétaux supérieurs, le lindane inhibe la division cellulaire et serait également à

l'origine de perturbation du métabolisme des protéines (10).

Dans ce travail nous étudions l'action de ce pesticide sur la motilité flagellaire des spermatozoïdes de rat.

Matériel et méthodes

Matériel: Des rats mâles Sprague-Dawley de plus de 120 jours, dont le poids varie de 350 à 400g sont utilisés. Après avoir endormi l'animal avec du pentobarbital sodique à 6% en intra-péritonéale à raison de 0.1 ml pour 100g de poids, l'épididyme est prélevé par dissection. La structure de la molécule utilisée, le lindane (δ hexachlorocyclohexane) est représentée dans le schéma suivant :

Préparation de la suspension de spermatozoïdes: Après incision de la queue de l'épididyme quelques μ l du fluide épидидymaire sont prélevés puis dilués dans un milieu synthétique composé de NaCl 90 mM, NaHCO_3 29.7 mM, KCl 11 mM, Lactate de Ca 3.4 mM, Pyruvate de Na 2.3 mM, glucose 6.6 mM, Sérum Albumine Bovine (BSA) 1g pour 100 ml. Le lindane est dilué dans du DMSO (0.2% v/v) et est ajouté dans 3 ml du milieu synthétique. Trois concentrations de lindane sont utilisées est ensuite homogénéisé puis incubé à 37°C.

Préparation microscopique: Pour l'observation, 25 μ l de la suspension de spermatozoïdes sont placés entre lame et lamelle. Une épaisseur de 35 μ m permet l'observation d'une

couche monocellulaire avec une faible contrainte du mouvement flagellaire.

Analyse du mouvement par vidéomicrographie: Les films sont enregistrés à un grossissement final de $\times 100$ (objectif 10) avec un système Vidéo NAC High Speed Video HVS, 200, caméra à grande vitesse: 200 images par seconde et un enregistreur. Pour chaque échantillon, une séquence est enregistrée pendant 2 heures. Le pourcentage des spermatozoïdes mobiles est évalué en pointant sur l'écran les spermatozoïdes mobiles progressifs qui se déplacent et que nous avons désigné par MP (Mobiles Progressifs), les

spermatozoïdes mobiles non progressifs, qui bougent, mais qui ne se déplacent pas, désignés par MNP (Mobiles Non Progressifs), les spermatozoïdes immobiles, (I). L'analyse de la trajectoire de la tête a été réalisée en pointant la base de celle-ci toutes les 50 millisecondes pendant 1 seconde (toutes les 10 images); un transparent étant placé sur l'écran. La vitesse de progression rectiligne (V_p) est exprimée en $\mu\text{m.s}^{-1}$.

Pour l'analyse flagellaire, la fore du flagelle est dessinée sur un transparent placé contre l'écran toutes les 20 millisecondes. Les paramètres sont: la fréquence de battement (nombre de battements par seconde) et l'amplitude de l'enveloppe flagellaire. Les mesures sont effectuées sur 20 images (1 image toutes les 20 millisecondes, pendant 400 millisecondes).

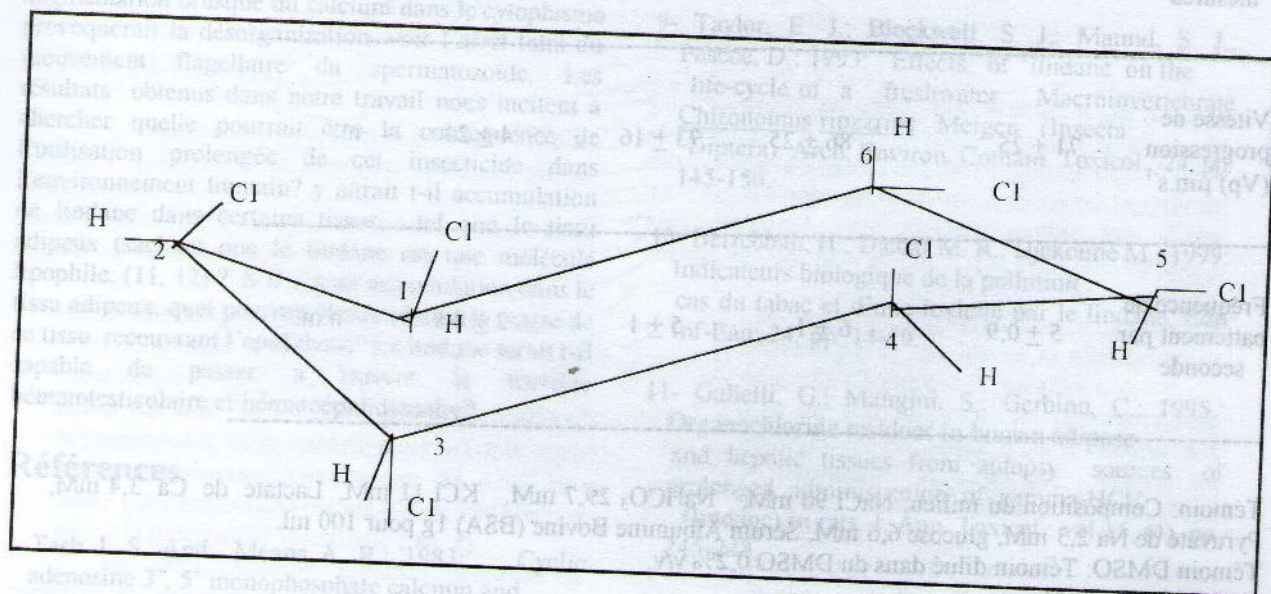


Figure 1 : Structure de lindane (δ hexachlorocyclohexane)

Résultats

La figure 1 illustre l'effet du lindane sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles après une minute d'action. Chez les témoins, 70% à 73% des spermatozoïdes sont mobiles progressifs (MP). Le lindane à la concentration de $1,3 \times 10^{-4}$ M n'a aucun effet sur la motilité des spermatozoïdes après une minute d'action; 76% d'entre eux sont de type MP. Le pourcentage des spermatozoïdes MP diminue de 50% avec la concentration $1,9 \times 10^{-4}$ M de lindane et avec $3,2 \times 10^{-4}$ M tous les spermatozoïdes mobiles présentent un mouvement désordonné d'agitation sur place, non progressif (MNP). Les mesures effectuées après 10 minutes et 20 minutes d'action du lindane montrent qu'à la plus forte concentration ($3,2 \times 10^{-4}$ M), tous les spermatozoïdes sont immobiles.

Le tableau 1 illustre l'effet du lindane sur la vitesse de progression des spermatozoïdes et sur la fréquence de leur battement flagellaire. A partir de la concentration $1,9 \times 10^{-4}$ M, la vitesse de progression (Vp) est réduite de 50% par rapport à celle du témoin

DMSO; le même résultat est obtenu pour la fréquence du battement flagellaire qui est de l'ordre de 2 pour les échantillons traités par le lindane, alors qu'elle est de l'ordre de 6 chez les témoins DMSO. Cependant, pour la plus faible concentration de lindane, les vitesses de progression et les fréquences de battement sont du même ordre de grandeur que celles des témoins, tandis qu'à la concentration de $3,2 \times 10^{-4}$ M, le lindane inhibe totalement la propagation de l'onde flagellaire.

La figure 2 représente des têtes de spermatozoïdes témoins (A) et traités par le lindane (B). Les spermatozoïdes traités ont perdu la capacité de se déplacer selon une trajectoire régulière et linéaire. Par comparaison avec les spermatozoïdes témoins (E), après une application de la concentration la plus faible de lindane ($1,3 \times 10^{-4}$ M), une courbure apparaît près de la tête du spermatozoïde, après 20 minutes d'action (F). Cette courbure, proche de la base de la tête, est observée au bout d'une minute d'action pour les concentrations $1,9 \times 10^{-4}$ M et $3,2 \times 10^{-4}$ M. La décomposition du mouvement flagellaire permet de confirmer cette courbure chez les spermatozoïdes traités par le lindane (D) comparés aux témoins (C).

Tableau 1. Evolution des vitesses de progression (Vp) et fréquences de battement des spermatozoïdes de rat au temps t = 1 minute.

Paramètres mesurés	Témoin	Témoin DMSO	Lindane 1,3	Lindane (10^{-4} M) 1,9	Lindane (10^{-4} M) 3,2
Vitesse de progression (Vp) $\mu\text{m.s}^{-1}$	71 $\pm$ 25	86 $\pm$ 25	73 $\pm$ 16	4 $\pm$ 24	n..
Fréquence de battement par seconde	5 $\pm$ 0,9	6 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0,9	n.m.

Témoin: Composition du milieu: NaCl 90 mM, NaHCO₃ 29,7 mM, KCl 11 mM, Lactate de Ca 3,4 mM, Pyruvate de Na 2,3 mM, glucose 6,6 mM, Sérum Albumine Bovine (BSA) 1g pour 100 ml.
Témoin DMSO: Témoin dilué dans du DMSO 0,2% v/v.
n.m.: Non mesurable.

leur flagelle que les spermatozoïdes témoins (1, 2). L'effet du lindane sur la motilité des spermatozoïdes est dose-dépendant. Ce sont les chi du tractus genital qui sont à l'origine de la migration des spermatozoïdes le long de l'oviducte. Il est clair que toute perturbation du mouvement de ces chi et flagelles pourrait avoir des conséquences néfastes pour les fonctions reproductives des animaux (1, 2).

Les Mammifères, le lindane module essentiellement la motilité des spermatozoïdes et agit sur la fréquence de battement de leur flagelle. Les protozoaires ciliés ou flagellés, les protozoaires à mouvement amoibe, les insectes, les mollusques, les annélides, les poissons, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux, les mammifères, le lindane module essentiellement la motilité des spermatozoïdes et agit sur la fréquence de battement de leur flagelle. Les protozoaires ciliés ou flagellés, les protozoaires à mouvement amoibe, les insectes, les mollusques, les annélides, les poissons, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux, les mammifères, le lindane module essentiellement la motilité des spermatozoïdes et agit sur la fréquence de battement de leur flagelle.

Discussion

A la concentration de 1.9×10^{-4} M, le lindane perturbe le mouvement des spermatozoïdes de rat dès la mise en contact et à la concentration de 1.3×10^{-4} M, il perturbe le battement flagellaire après 20 minutes d'action. Le mouvement flagellaire est totalement inhibé dès la mise en contact avec le lindane à une concentration de 3.2×10^{-4} M. Le lindane, molécule cilio-inhibitrice chez *Dunaliella bioculata* (6, 7) est toxique pour les spermatozoïdes de rat dès la mise en contact mais à une concentration deux fois plus élevée que pour *Dunaliella*. Le modèle spermatozoïde de rat, dont nous venons d'établir le comportement en présence de lindane, paraît donc particulièrement adapté pour redéfinir les mécanismes d'initiation et de régulation du battement flagellaire. Ceux-ci paraissent indépendants de la concentration en calcium du milieu extracellulaire, contrairement à certaines études récemment effectuées sur des Invertébrés (8) ou des Mammifères (9); puisque des expériences récentes menées sur l'action de différentes concentrations de lindane sur l'onde flagellaire, en milieu dépourvu de calcium, donnent des résultats identiques à ceux obtenus en milieu riche en calcium (données non présentées). L'hypothèse que nous sommes actuellement entrain de vérifier, est que le lindane pourrait inhiber le mouvement du spermatozoïde de rat par une augmentation de la sortie de calcium à partir des organites intracellulaires. Le lieu de stockage du calcium chez les spermatozoïdes pourrait être localisé au niveau de la calmoduline (11). Cette augmentation brusque du calcium dans le cytoplasme provoquerait la désorganisation, voir l'arrêt total du mouvement flagellaire du spermatozoïde. Les résultats obtenus dans notre travail nous incitent à chercher quelle pourrait être la conséquence de l'utilisation prolongée de cet insecticide dans l'environnement humain? y aurait-il accumulation de lindane dans certains tissus; tel que le tissu adipeux (sachant que le lindane est une molécule lipophile, (11, 12) ? S'il y avait accumulation dans le tissu adipeux, quel pourrait être le rôle de la masse de ce tissu recouvrant l'épididyme? Le lindane serait-il capable de passer à travers la barrière hémotesticulaire et hématoépididymaire?

Références

- 1 Tash J. S. And Means A. R.; 1983: Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. Biol. Reprod.; 28, 75-104.
- 2-Jeulin C. And Soufir J-C; 1992: Reversible intracellular ATP changes in intact rat

- spermatozoa and effects on flagellar sperm movement. Cell Motility and Cytoskeleton; 21, 210-216.
- 3- Luck, D. J. L.; 1984: Genetic and biochemical dissection of the eucaryotic flagellum. J. Cell. Biol.; pp. 789-794.
- 4- Berrebbah, H.; Djebar, M. R.; 1997: Role of intracellular calcium in the control of motility of *Dunaliella*. Synthèse; N°2, pp. 69-78.
- 5- Mogami, Y.; Takahashi, K.; 1983: Calcium and microtubule sliding in ciliary axonemes isolated from *Paramecium caudatum*. J. Cell. Sci.; 67, pp. 107-121.
- 6-Berrebbah, H.; 1990: Etude du contrôle de la mobilité flagellaire et ciliaire par le calcium. Effet du lindane, insecticide organochloré. Thèse de Doctorat. Univ. Paris VII.; pp. 143.
- 7-Marchal-Segault, D.; Ramade J.; 1981: The effects of lindane, an insecticide, on hatching and postembryonic development of *Xenopus laevis*. Daudin au uran amphibian. Environ. Res.; 24, pp. 250-258.
- 8- Munir, K. M.; Rao, J. V. K.; Bhilde, S. V.; 1984: Effects of hexachlorocyclohexane on diethylnitrosamine induced hepatocarcinogenesis in rat and its failure to promote skin tumors on dimethyl-benz (a) anthracene initiation in mouse. Carcinogenesis; 5, P479-481
- 9- Taylor, E. J.; Blockwell, S. J.; Maund, S. J.; Pascoe, D.; 1993: Effects of lindane on the life-cycle of a freshwater Macroinvertebrate *Chironomus riparius* Meigen (Insecta: Diptera). Arch. Environ. Contam. Toxicol.; 24, pp. 145-150.
- 10- Berrebbah, H.; Djebar M. R.; Djekoune M.; 1999: Indicateurs biologique de la pollution : cas du tabac et d'une toxicité par le lindane. Edil Inf-Eau; 24, pp. 14-19.
- 11- Gallelli, G.; Mangini, S.; Gerbino, C.; 1995: Organochlorine residues in human adipose and hepatic tissues from autopsy sources of prolonged administration of gamma-HCH (lindane) in rats. J. App. Toxicol.; vol 15, (4), pp. 245-248.
- 12- Sabra, M. C.; Jorgensen, K.; Mouritsen, O. G.; 1995: Calorimetric and theoretical studies of the effects of lindane on lipids bilayers of different acyl chain length. Biochem. Biophys. Acta, Biomembranes, 1233, (1), pp. 89-104.

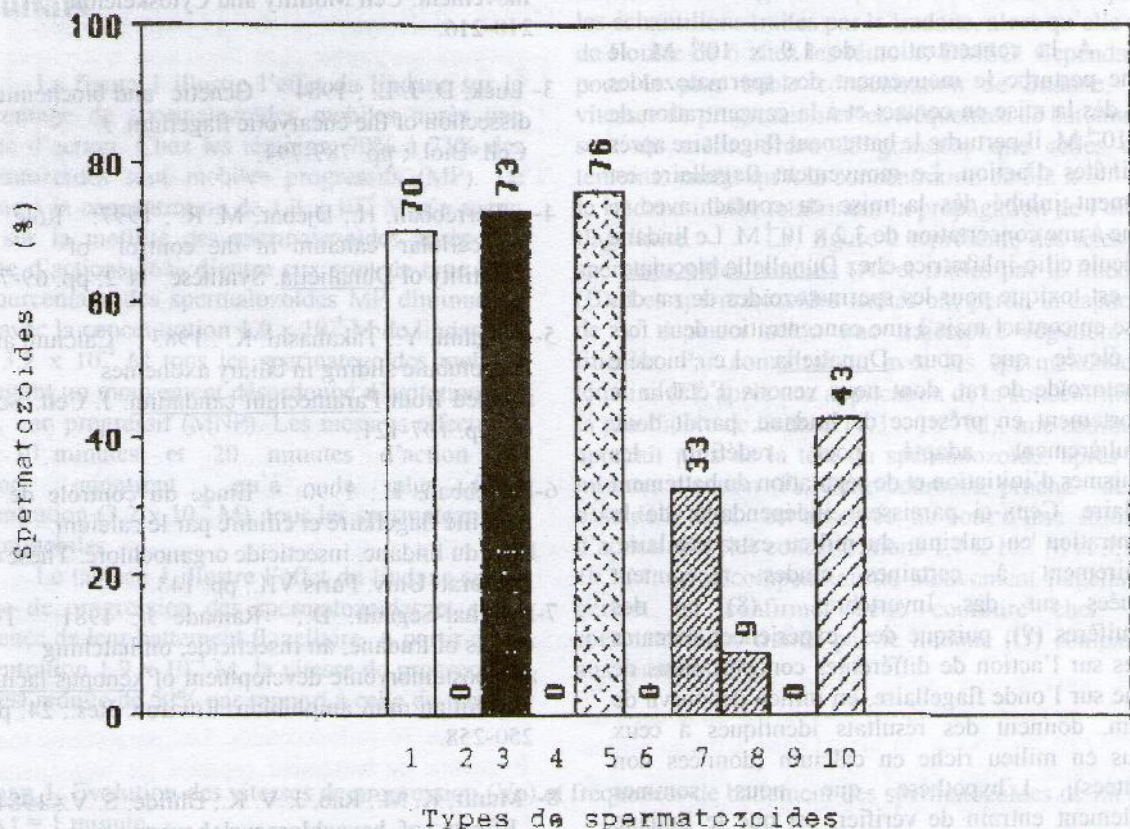


Fig 2 : Effet du lindane à différentes concentrations sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles de rat après une minute d'action

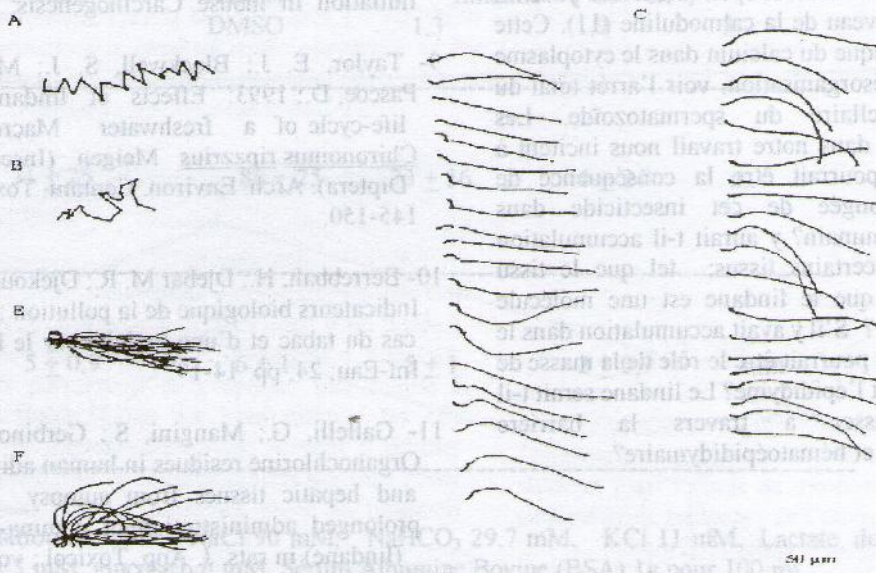


Fig 3 : Trajectoires de la tête et de la dynamique flagellaire des spermatozoïdes de rat