

Différenciation et Communication Neuroendocrine, Endocrine et Germinale (NorDiC)

Préservation et restauration de la fertilité du garçon prépubère traité pour cancer : différenciation in vitro des cellules souches spermatogoniales humaines issues de tissus testiculaires prépubères humains congelés

Preservation and restoration of fertility in prepubertal boys treated for cancer: in vitro differentiation of human spermatogonial stem cells from frozen human prepubertal testicular tissue

Unité de recherche / Research Unit

INSERM U1239

Université de ROUEN

Sujet de thèse / Thesis subject

La congélation du tissu testiculaire (CTF) est proposée pour préserver la fertilité des garçons prépubères avant traitement du cancer à forte toxicité sur la cellule souche spermatogonale (CSS). La spermatogenèse in vitro est l'une des approches potentielles pour restaurer la fertilité après la guérison à partir du tissu testiculaire congelé. Notre équipe a développé un protocole de CTF chez la souris prépubère utilisé en application humaine au niveau national et a été la deuxième équipe au niveau international à produire in vitro des spermatozoïdes à partir du tissu testiculaire prépubère murin. Nous avons par ailleurs démontré l'effet bénéfique de la supplémentation en rétinol et en antioxydants sur la maturation in vitro du tissu testiculaire frais et décongelé de souris prépubère jusqu'au stade spermatozoïdes dans un système de culture organotypique en interphase gaz-liquide. Cette spermatogenèse in vitro reproduit les différentes étapes et mécanismes physiologiques observés in vivo. Nos données préliminaires obtenues en spermatogenèse in vitro chez le rat prépubère démontre que notre système de culture organotypique permet également la différenciation des CSS jusqu'au stade de spermatide ronde dans ce modèle. Ainsi, nous souhaitons évaluer la capacité des cellules souches spermatogoniales (CSS) humaines issues du tissu testiculaire prépubère congelé à se différencier in vitro jusqu'au stade de cellules haploïdes post-méiotiques. Ce projet de recherche sera conduit sur des échantillons biologiques déjà disponibles présents au sein du centre de ressources biologiques « Germethèque » pour lesquels nous avons le consentement d'utilisation dans le cadre de la recherche. Ces échantillons sont issus de garçons prépubères ayant bénéficié d'une préservation de la fertilité par CTT avant traitement du cancer.

L'objectif de notre projet sera :

- d'évaluer l'impact de deux conditions de culture différentes avec ou sans utilisation d'un support élaboré en polydiméthylsiloxane sur la différenciation in vitro des CSS humaines,
- d'explorer l'évolution de l'identité et la fonctionnalité des CSS aux différents temps de culture par transcriptomique sur cellules uniques,
- d'explorer la fonctionnalité et la maturation des cellules de Leydig et de Sertoli aux différents temps de culture,
- d'évaluer l'impact de l'âge du patient sur la capacité des CSS à se différencier in vitro.

Testicular tissue freezing (TTF) is proposed to preserve fertility in prepubertal boys prior to cancer treatment with highly gonadotoxicity on spermatogonial stem cells (SSC). In vitro spermatogenesis is one of the potential approaches to restore fertility using frozen-thawed testicular tissue. Our team has developed a TTF protocol in prepubertal mice nationally used in human application and was the second international team to produce in vitro spermatozoa from mouse prepubertal testicular tissue. We also demonstrated the beneficial effect of retinol and antioxidant supplementation on the in vitro maturation of fresh and thawed prepubertal mouse testicular tissue to spermatozoa stage in a gas-liquid interphase organotypic culture system. This in vitro spermatogenesis system reproduces the different stages and physiological mechanisms observed in vivo. Our preliminary data also obtained from in vitro spermatogenesis of rat prepubertal testicular tissue demonstrate that our organotypic culture system also allows the differentiation of SSC up to the round spermatid stage in

this model. Thus, we wish to evaluate the ability of human spermatogonial stem cells (SSC) derived from frozen prepubertal testicular tissue to differentiate in vitro to the post-meiotic haploid cell stage. This research project will be conducted on frozen biological samples already available in the biological resource centre "Germethèque" for which we have an informed consent for research use. These samples were obtained from prepubertal boys who have undergone fertility preservation by TTF before cancer treatment.

The objective of our project will be :

- to evaluate the impact of two different culture conditions with or without the use of a polydimethylsiloxane support on the in vitro differentiation of human SSC,
- to explore the identity and functionality of SSC at different culture time points using Single cell RNA-Sequencing,
- to explore the functionality and in vitro maturation of Leydig and Sertoli cells at different culture time points,
- to evaluate the impact of the patient's age on the ability of SSC to differentiate in vitro.

Expérience et formation souhaitées / searched skills

Le candidat devra avoir validé une Licence et un Master 1 en biologie ou physiologie cellulaire, incluant éventuellement une ou plusieurs unités d'enseignement en Biologie ou Physiologie de la Reproduction.

Le candidat devra avoir validé un Master 2 Recherche issu de l'Université de Rouen ou de toute autre université. Une expérience dans le domaine de la culture cellulaire, de l'immunocytochimie et de la biologie moléculaire serait souhaitable.

En Anglais :

The candidate should have validated a License and a Master degree in biology or cell physiology, including possibly one or more teaching units in Biology or Reproductive Physiology. The candidate should have a Master 2 Research degree from the University of Rouen or any other university. Experience in the field of cell culture, immunocytochemistry and molecular biology would be preferable.

Contacts

Nathalie RIVES

nathalie.rives@chu-rouen.fr

06 32 66 11 50