

Unité de recherche	Unité Inserm UMR1239 Equipe 1 « Physiopathologie surrénalienne et gonadique » Université de Rouen Normandie
Sujet de thèse	Restauration de la fertilité : optimisation de la maturation <i>in vitro</i> du tissu testiculaire prépubère

Contact : Christine RONDANINO (christine.rondanino@univ-rouen.fr)

Envoyer un CV, une lettre de motivation et 2 références

Environ 2550 nouveaux cas de cancers pédiatriques sont diagnostiqués annuellement. La congélation du tissu testiculaire est proposée aux garçons et adolescents atteints d'un cancer pour préserver leur fertilité avant le début de traitements hautement gonadotoxiques. La maturation *in vitro* du tissu testiculaire décongelé est l'une des approches potentielles pour restaurer la fertilité après la guérison. Cette procédure permettrait d'obtenir *in vitro* des spermatozoïdes utilisables en Assistance Médicale à la Procréation. Elle pourrait être proposée aux patients ne pouvant pas bénéficier d'une greffe de tissu testiculaire en raison de la contamination de celui-ci par des cellules cancéreuses (environ 30% des patients atteints d'une leucémie aigüe).

Notre équipe a développé un protocole de congélation de tissu testiculaire prépubère chez la souris utilisé pour la pratique médicale actuelle au niveau national et international, et a été la deuxième équipe au niveau international à produire *in vitro* des spermatozoïdes à partir du tissu testiculaire de souris prépubère. Le protocole de culture *in vitro* actuel ne peut cependant pas être transposé en clinique car il ne permet qu'une très faible production de spermatozoïdes.

Nos études récentes ont mis en évidence une altération de la stéroïdogénèse dans les tissus cultivés *in vitro*, qui pourrait en partie expliquer la faible efficacité de cette procédure. Nous étudions depuis peu deux neuropeptides, Kp10 et 26RFa, qui pourraient stimuler l'activité stéroïdogène des cellules de Leydig au sein du testicule. De plus, dans le but de se rapprocher des conditions physiologiques, nous souhaitons développer un protocole de culture organotypique séquentielle. Pour ce faire, nous cherchons à optimiser séparément les étapes de méiose et de spermiogénèse en déterminant quels facteurs sont essentiels lors de ces étapes. Par ailleurs, nous avons récemment mis en œuvre au sein du laboratoire la technique d'analyse multiomique en cellule unique, combinant les approches scRNA-seq et scATAC-seq. Les données obtenues ont permis d'analyser pour la première fois la spermatogénèse *in vitro* et *in vivo* au niveau moléculaire et à l'échelle de la cellule unique. L'exploitation de ces données, en particulier du transcriptome des différentes populations de cellules (germinales et somatiques) maturées *in vitro* ou *in vivo*, pourrait permettre d'ouvrir de nouvelles pistes pour optimiser le protocole de culture organotypique.

Les objectifs de ce projet de recherche, qui s'inscrit dans la continuité des projets précédents, seront :

- de tirer parti des données scRNA-seq et scATAC-seq afin d'optimiser la méiose et la spermiogénèse *in vitro* et développer un protocole de culture séquentielle
- d'étudier le rôle des neuropeptides Kp10 et 26RFa au sein du testicule et d'évaluer leur capacité à optimiser la stéroïdogénèse et la spermatogénèse *in vitro*

Ce projet permettra de progresser dans la mise au point de cette procédure de restauration de la fertilité et d'envisager par la suite des essais de maturation *in vitro* de tissu testiculaire

d'enfants et d'adolescents traités pour un cancer dans le cadre d'un projet de recherche translationnelle.

Le candidat devra avoir validé une Licence, un Master 1 et un Master 2 en biologie ou physiologie cellulaire, incluant éventuellement une ou plusieurs unités d'enseignement en Biologie ou Physiologie de la Reproduction. Une expérience dans le domaine de la culture cellulaire, de l'immunohistochimie et de la biologie moléculaire serait souhaitable.

Research team	Inserm UMR1239 unit Team 1 « Adrenal and Gonadal Pathophysiology » University of Rouen Normandy
PhD project	Fertility restoration: optimization of the <i>in vitro</i> maturation of prepubertal testicular tissue

Contact : Christine RONDANINO (christine.rondanino@univ-rouen.fr)
Send a CV, a covering letter and 2 references

Around 2,550 new cases of pediatric cancer are diagnosed each year. Testicular tissue freezing is proposed to boys and adolescents with cancer to preserve their fertility before highly gonadotoxic treatments. *In vitro* maturation of thawed testicular tissue is one of the potential approaches being considered to restore fertility after recovery. This procedure could allow the *in vitro* production of spermatozoa that could be used for assisted reproduction. It could be proposed to patients who cannot benefit from testicular tissue grafting due to its contamination by cancer cells (around 30% of patients with acute leukemia).

Our team has developed a protocol for freezing prepubertal testicular tissues, which is proposed for current medical practice both nationally and internationally. We are also the second international team to have succeeded in producing spermatozoa *in vitro* from thawed prepubertal mouse testicular tissue. However, the current *in vitro* culture protocol cannot be transposed to the clinic, as it allows only very low sperm production.

Our recent studies have highlighted an alteration in steroidogenesis in *in vitro* cultured tissues, which could partly explain the low efficiency of this procedure. We have recently investigated two neuropeptides, Kp10 and 26RFa, which could stimulate the steroidogenic activity of Leydig cells in the testis. Furthermore, in order to get closer to physiological conditions, we would like to develop a sequential organotypic culture protocol. To this end, we aim to optimize meiosis and spermiogenesis separately, by determining which factors are essential during these steps. In addition, we have recently implemented in the laboratory the single-cell multiomics technique, combining scRNA-seq and scATAC-seq approaches. The data obtained have enabled us to analyze *in vitro* and *in vivo* spermatogenesis for the first time, at both molecular and single-cell levels. The exploitation of these data, in particular the transcriptome of the different cell populations (germ and somatic), could open up new avenues for optimizing the organotypic culture protocol.

The aims of this research project will be:

- to take advantage of the scRNA-seq and scATAC-seq data to optimize *in vitro* meiosis and spermiogenesis, and develop a sequential culture protocol
- to study the role of Kp10 and 26RFa in the testis and assess their ability to optimize *in vitro* steroidogenesis and spermatogenesis.

This project will allow us to progress in the development of this fertility restoration procedure, and to consider its application to testicular tissues from children and adolescents with cancer.

The candidate must have completed a Bachelor's degree and a Master's degree in biology or cell physiology, possibly including one or more teaching units in Reproductive Biology or Physiology. Experience in cell culture, immunohistochemistry and molecular biology would be desirable.