

Discipline : Développement et évaluation d'une stratégie innovante de restauration de la fertilité

Sujet : Restauration de la fertilité : maturation *in vitro* du tissu testiculaire prépubère et analyse de la méthylation de l'ADN des gamètes et des embryons

Acronyme : GAMBRYOME

Mots clés : culture organotypique, méthylome spermatique et embryonnaire, spermatogenèse, spermatozoïde, testicule prépubère

Direction de thèse : RONDANINO Christine

Unité de recherche : UMR1239 NorDiC « Différenciation et communication neuroendocrine, endocrine et germinale »

Etablissement : Université de Rouen Normandie

Type de financement : Contrat doctoral établissement

Contact : christine.rondanino@univ-rouen.fr

Chaque année, environ 2550 nouveaux cancers pédiatriques sont diagnostiqués. Les traitements nécessaires à leur guérison peuvent altérer durablement la fertilité. Pour préserver la paternité des garçons, la congélation de tissu testiculaire est proposée. Après guérison, la maturation *in vitro* de ce tissu pourrait permettre de produire des spermatozoïdes utilisables en assistance médicale à la procréation.

Notre équipe a développé la congélation du tissu testiculaire prépubère, aujourd'hui utilisée en pratique clinique, la première ayant eu lieu à Rouen en 2007. Nous sommes la deuxième équipe internationale à avoir produit des spermatozoïdes *in vitro* à partir de tissu testiculaire prépubère chez la souris. Toutefois, le protocole actuel ne permet qu'une production faible de spermatozoïdes. En raison de la rareté du tissu humain, nous poursuivons le développement de cette approche chez la souris.

Grâce à une analyse multiomique en cellule unique, nous avons identifié des gènes dont l'expression est altérée lors de la maturation *in vitro*. Nous avons commencé à exploiter ces données pour optimiser le protocole, mais une exploration plus large de différentes conditions reste nécessaire. Par ailleurs, certaines modifications chimiques de l'ADN (notamment la méthylation), qui jouent un rôle clé dans le développement de l'embryon, n'ont encore jamais été étudiées dans les spermatozoïdes produits *in vitro*.

Ce projet, qui s'inscrit dans la stratégie décennale de lutte contre le cancer et dans le plan national de lutte contre l'infertilité, vise donc à poursuivre l'optimisation de la maturation *in vitro* du tissu testiculaire et à analyser avec une technologie de pointe la méthylation de l'ADN dans les spermatozoïdes et les embryons obtenus après fécondation. Il contribuera à améliorer cette procédure de restauration de la fertilité et à en évaluer l'innocuité avant une application clinique.

Each year, around 2,550 new pediatric cancers are diagnosed. The treatments required for their cure can permanently impair fertility. To preserve future fertility in boys, testicular tissue freezing is proposed. After recovery, *in vitro* maturation of this tissue could enable the production of spermatozoa usable in assisted reproductive technologies.

Our team developed prepubertal testicular tissue freezing, which is now used in clinical practice, with the first procedure performed in Rouen in 2007. We are the second international team to have produced spermatozoa *in vitro* from prepubertal testicular tissue in mice. However, the current protocol only yields a limited number of spermatozoa. Due to the scarcity of human tissue, we are pursuing the development of this approach in the mouse model.

Using single-cell multiomic analysis, we identified genes whose expression is altered during *in vitro* maturation. We have begun to exploit these data to optimize the protocol, but a broader exploration of different conditions remains necessary. Moreover, certain chemical modifications of DNA (notably methylation), which play a key role in embryonic development, have never been studied in spermatozoa produced *in vitro*.

This project, which aligns with the ten-year national strategy to combat cancer and the national plan to combat infertility, therefore aims to further optimize in vitro maturation of testicular tissue and to analyze DNA methylation in spermatozoa and embryos obtained after fertilization using cutting-edge technology. It will contribute to improving this fertility restoration procedure and to assessing its safety before clinical application.