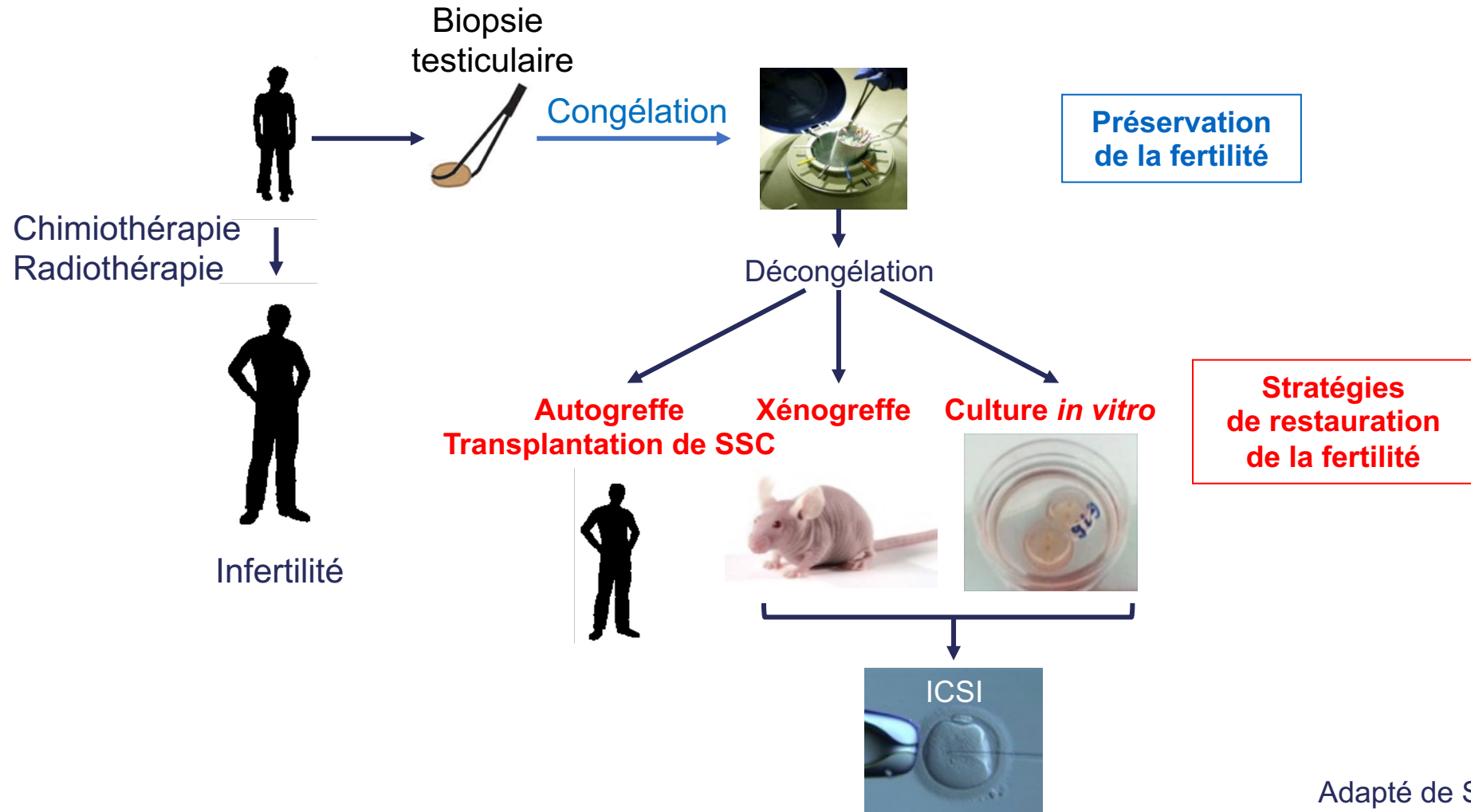


Les avancées de la spermatogenèse *in vitro* en 2023

Dr Christine Rondanino

Unité Inserm U1239 – Equipe « Physiopathologie surrénalienne et gonadique »
Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale
Laboratoire de Biologie de la Reproduction, CHU – Hôpitaux de Rouen
Directeur : Pr Nathalie RIVES

Préservation et restauration de la fertilité



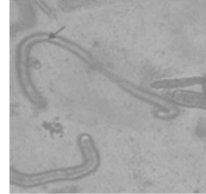
Adapté de Song *et al.*, 2003

Stratégies de restauration de la fertilité

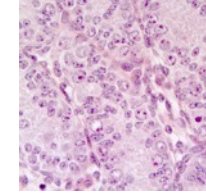
Suspension de
cellules testiculaires



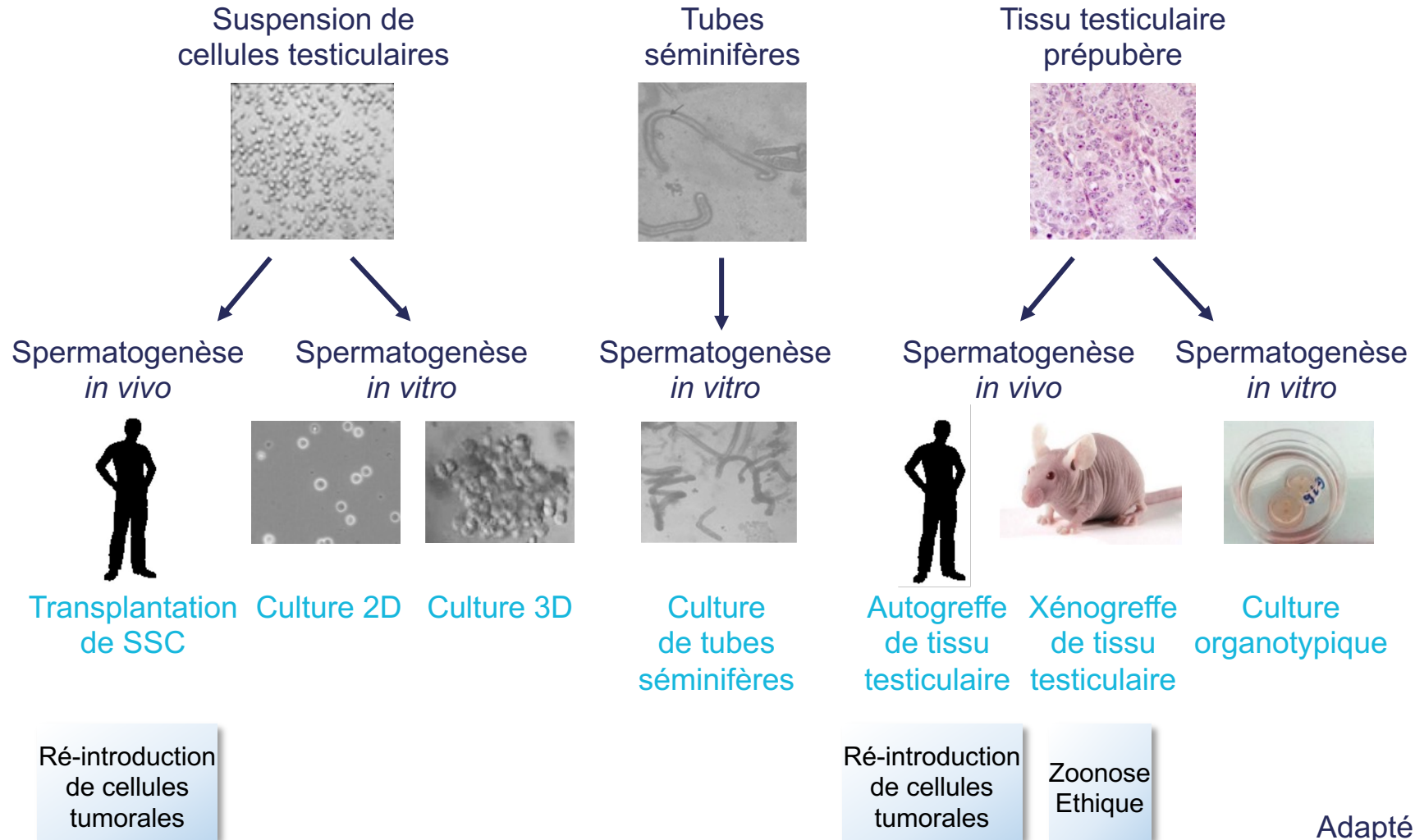
Tubes
séminifères



Tissu testiculaire
prépubère



Stratégies de restauration de la fertilité



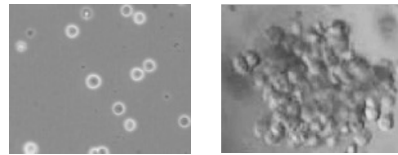
Adapté de Dores *et al.*, 2012

Stratégies de restauration de la fertilité

Suspension de
cellules testiculaires

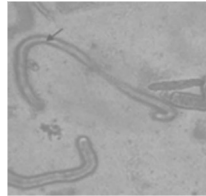


Spermatogenèse
in vitro

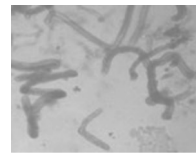


Culture 2D Culture 3D

Tubes
séminifères

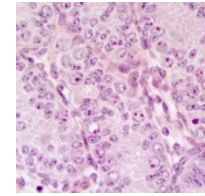


Spermatogenèse
in vitro

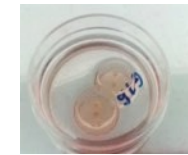


Culture
de tubes
séminifères

Tissu testiculaire
prépubère



Spermatogenèse
in vitro

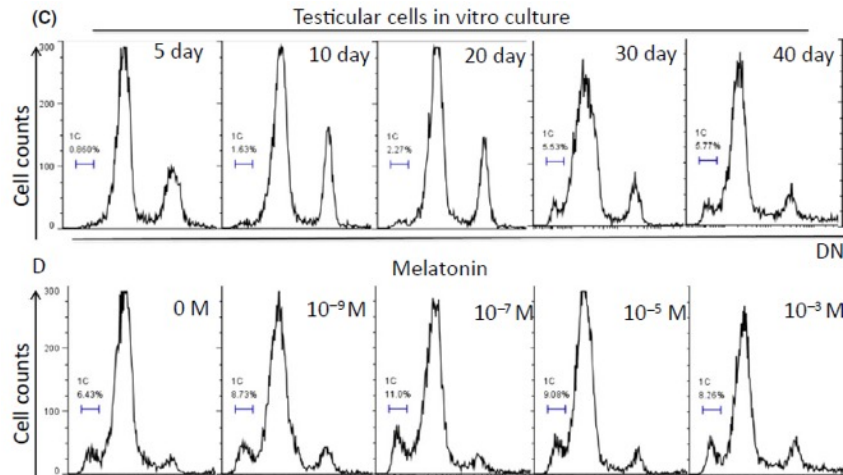
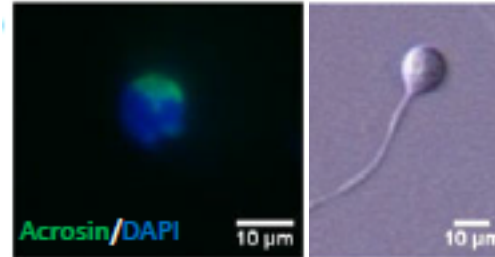


Culture
organotypique

Adapté de Dores *et al.*, 2012

Culture 2D de cellules testiculaires d'agneaux

Après 4 semaines

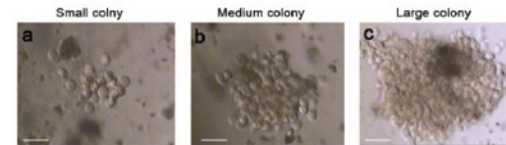
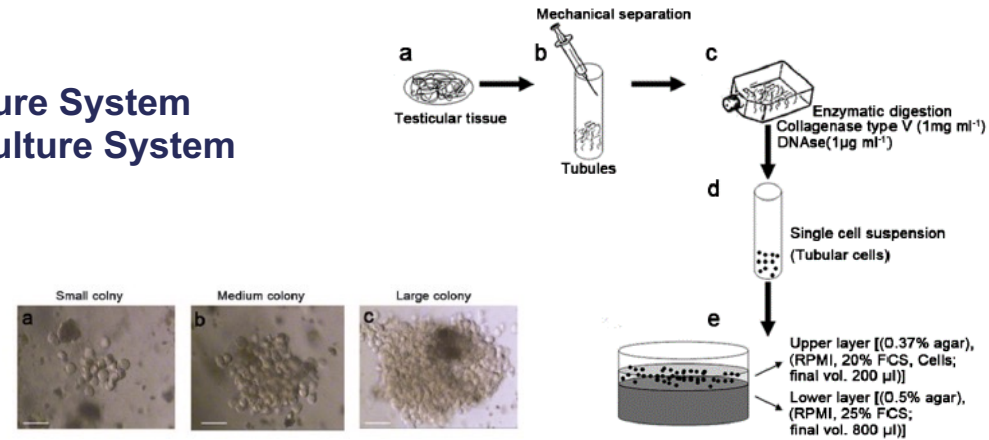


- Production de « sperm-like cells » haploïdes
- Obtention d'embryons au stade morula

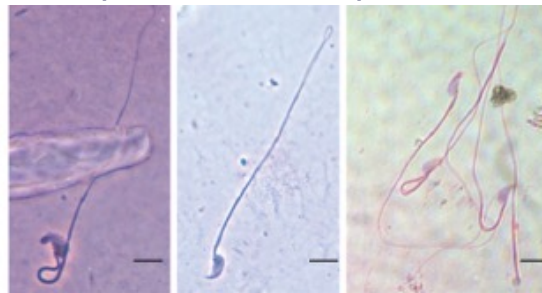
Deng *et al.*, 2016

Culture 3D de cellules testiculaires de souris et de macaque rhésus

SACS : Soft Agar Culture System
MCS : Methylcellulose Culture System

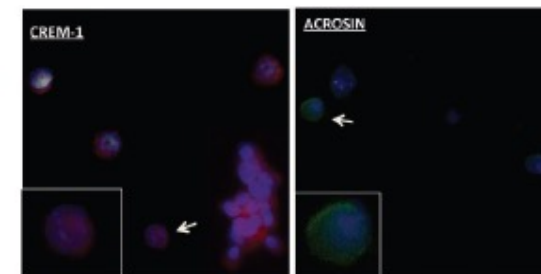


Après 30 jours (SACS)
 Souris : production de spermatozoïdes



Abu Elhija *et al.*, 2012

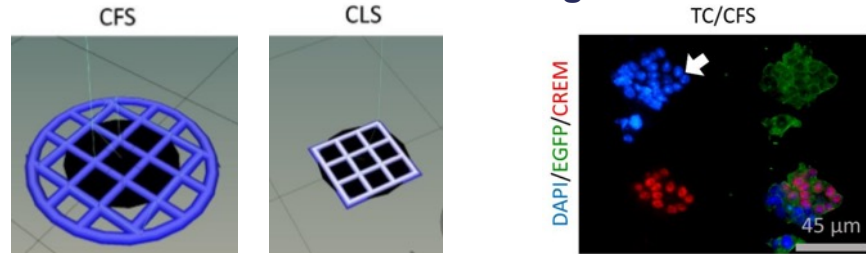
Après 30 jours (MCS)
 Macaque rhésus : Marqueurs méiotique et post-méiotique



Huleihel *et al.*, 2015

Culture 3D de cellules testiculaires de souris

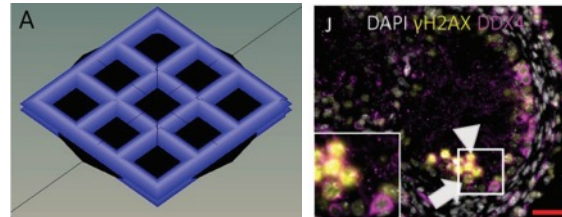
Matrices 3D d'alginate



Baert *et al.*, 2019

Après 48 jours

Production de spermatides
rondes et allongées

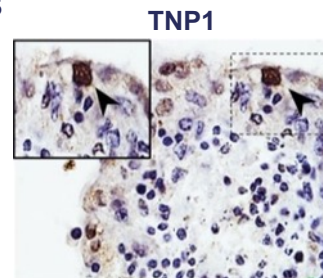
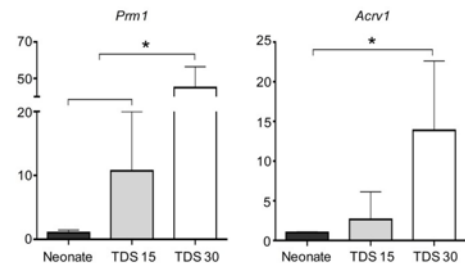
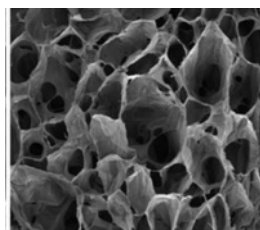


Richer *et al.*, 2021

Après 42 jours

Production de cellules méiotiques

Testicules décellularisés



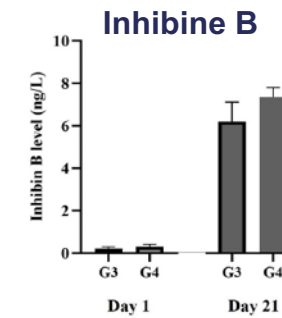
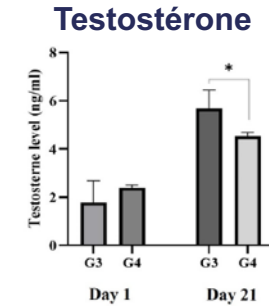
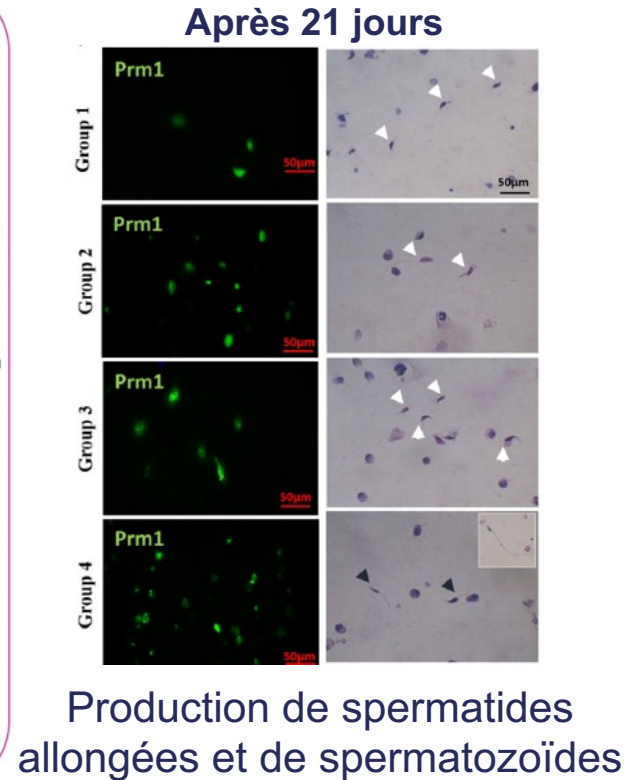
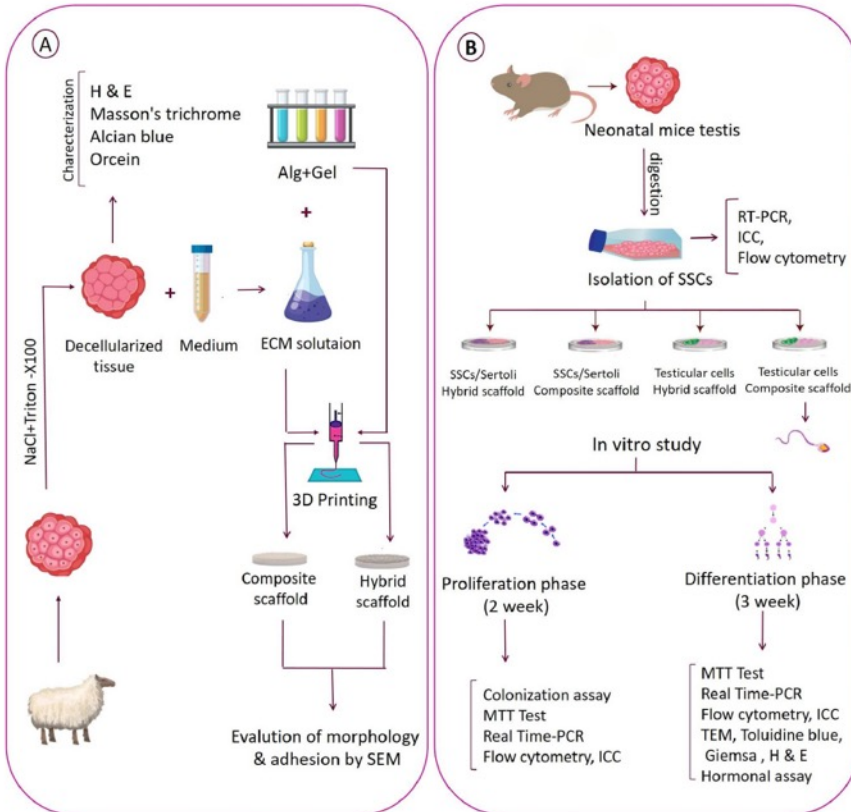
Topraggaleh *et al.*, 2019

Après 30 jours

Production de cellules post-méiotiques

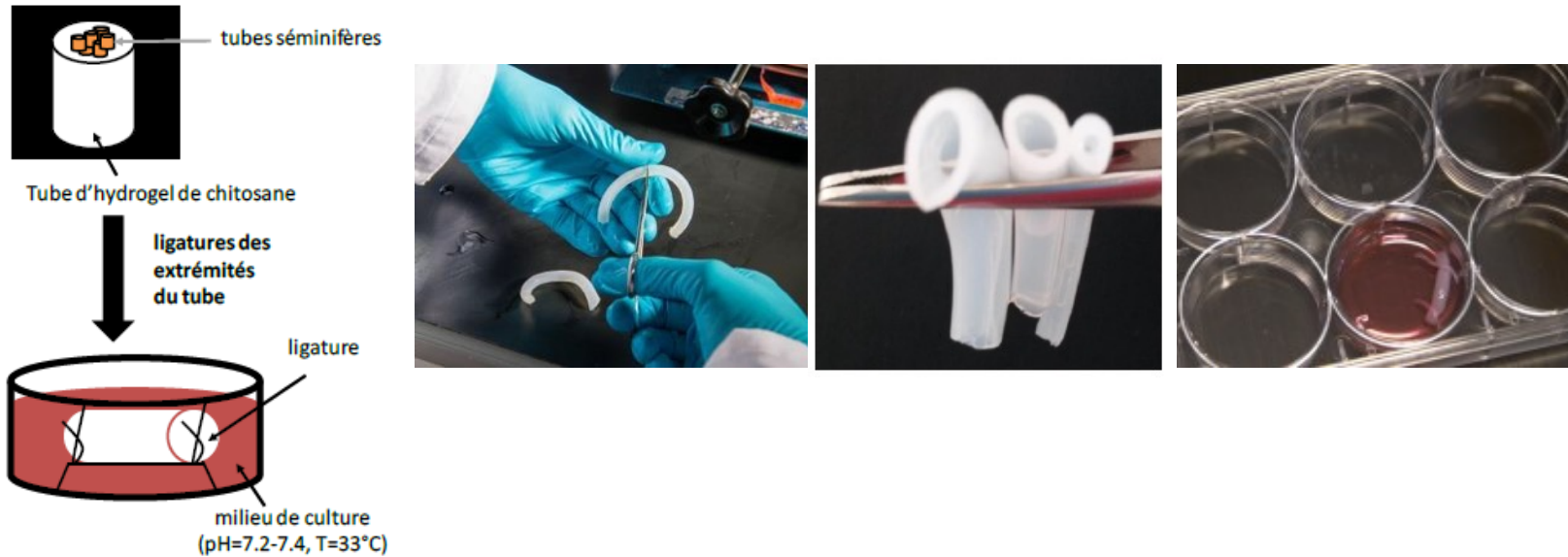
Culture 3D de cellules testiculaires de souris

Matrice extracellulaire imprimée en 3D

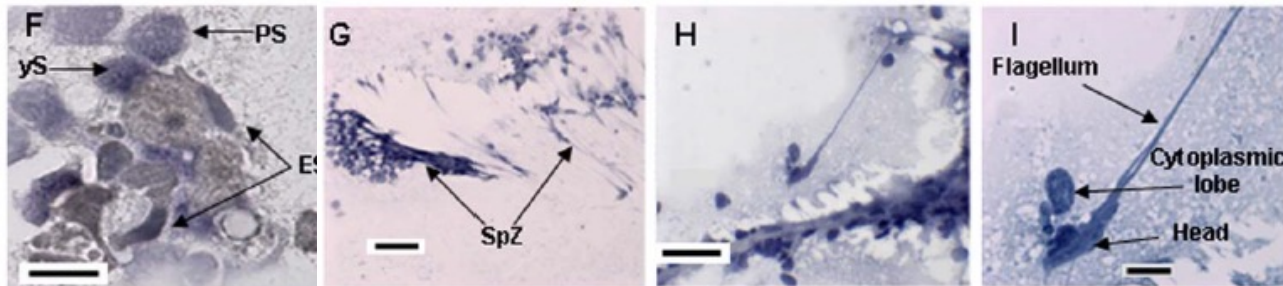


Bashiri *et al.*, 2022

Culture de tubes séminifères de rats



Après 61 jours

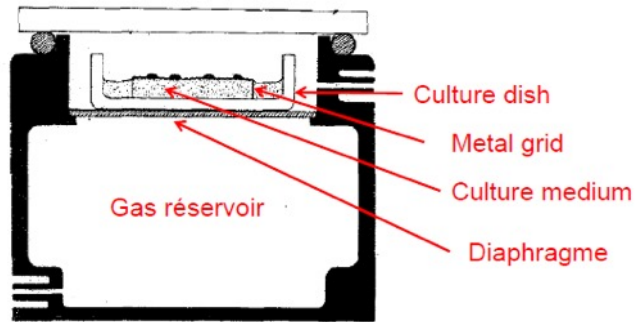


PS : spermatocyte pachytène
ES : spermatide allongée
SpZ : spermatozoïde

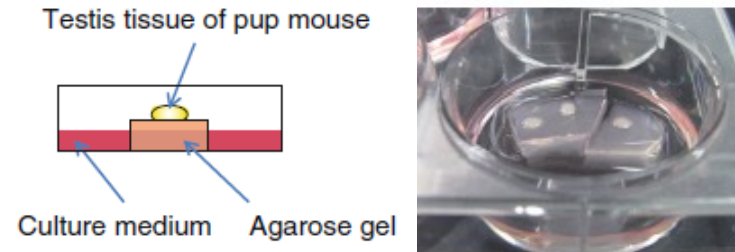
Production de « sperm-like cells »

Perrard *et al.*, 2016

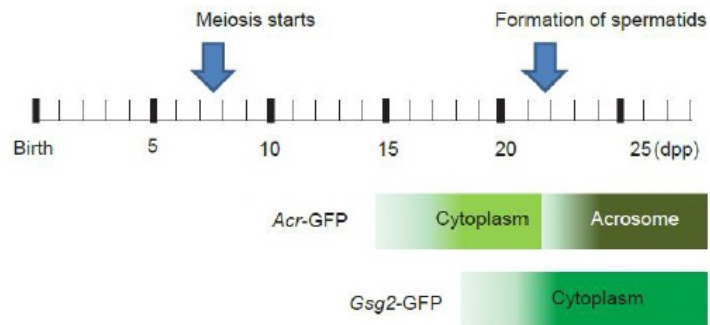
Culture de tissu testiculaire de souris



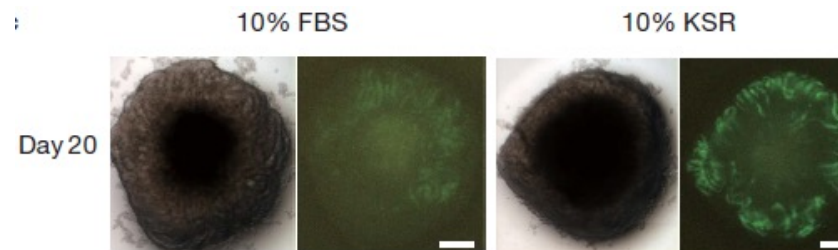
Steinberger & Steinberger, 1965



Sato *et al.*, 2011



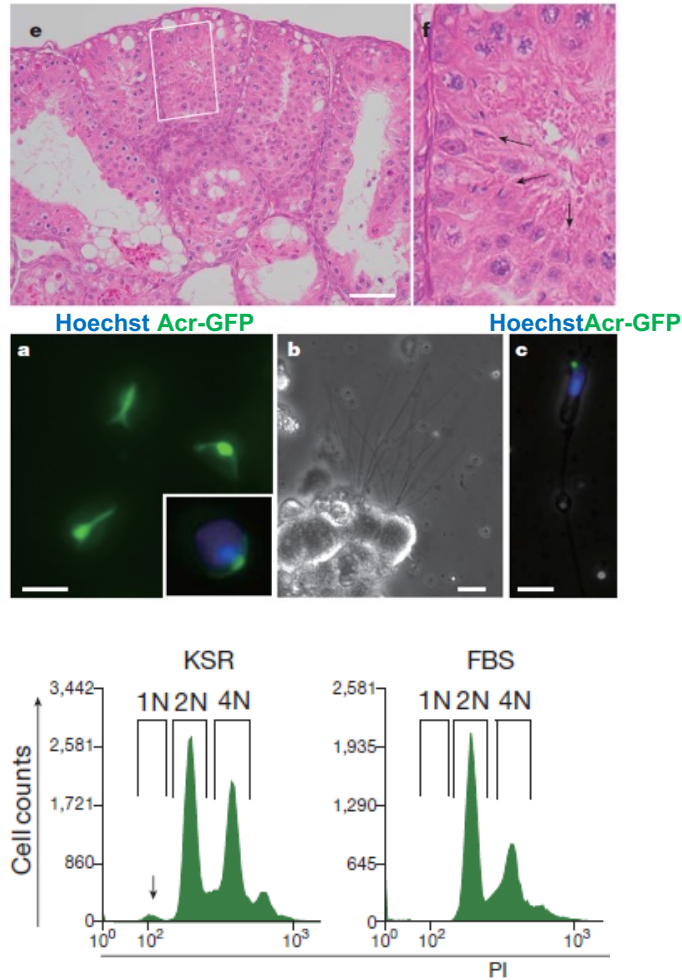
Tissu testiculaire de souris *Gsg2-GFP*



FBS : sérum de veau foetal

KSR : *knockout serum replacement*

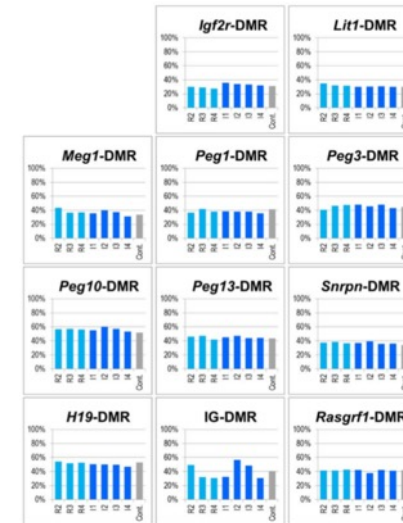
Culture de tissu testiculaire de souris



Congélation lente : ROSI



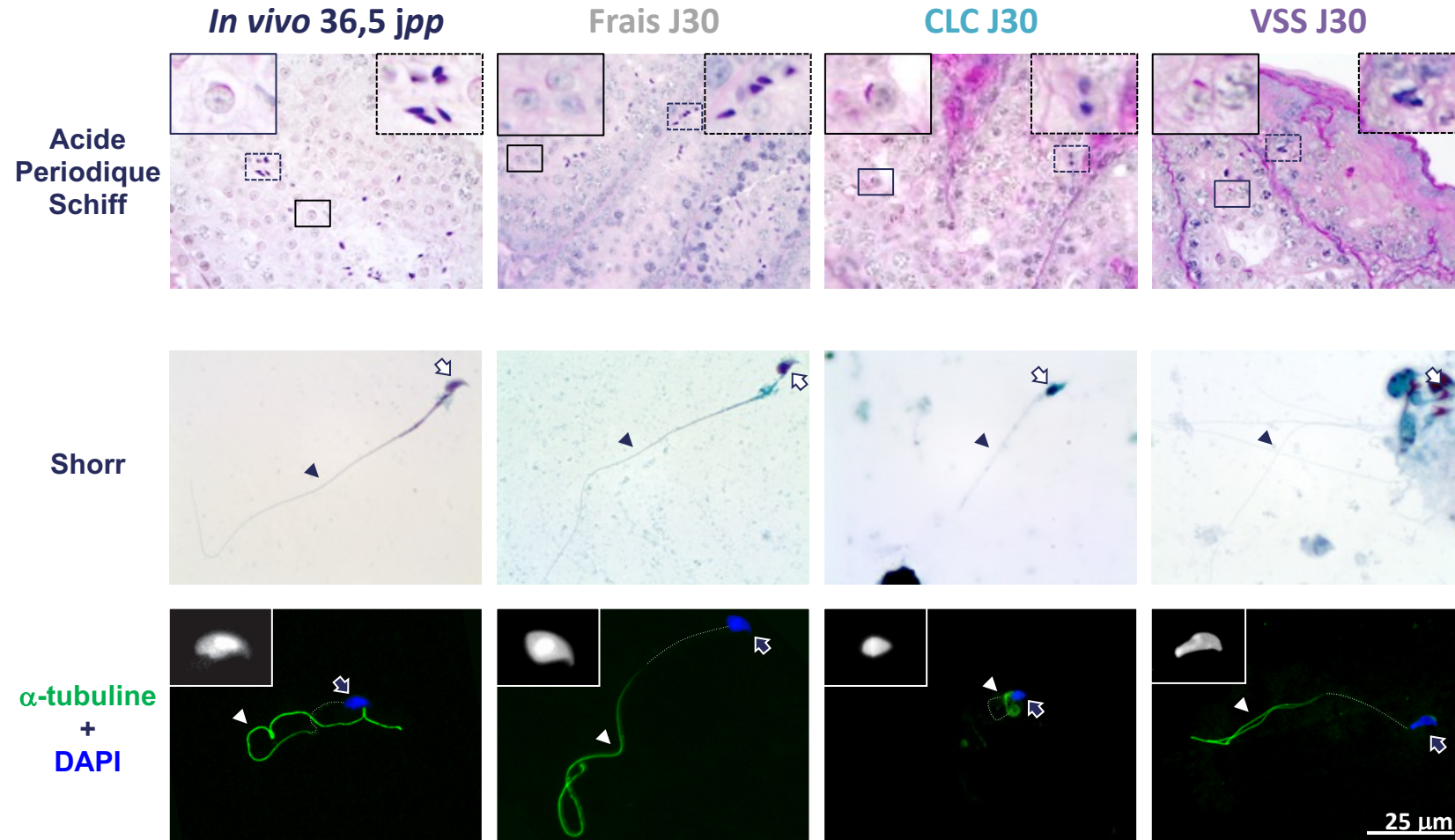
Vitrification : ICSI



- Production de spermatozoïdes haploïdes
- Obtention de descendants viables et fertiles
- Méthylation de 11 DMRs

Sato *et al.*, 2011
Yokonishi *et al.*, 2014

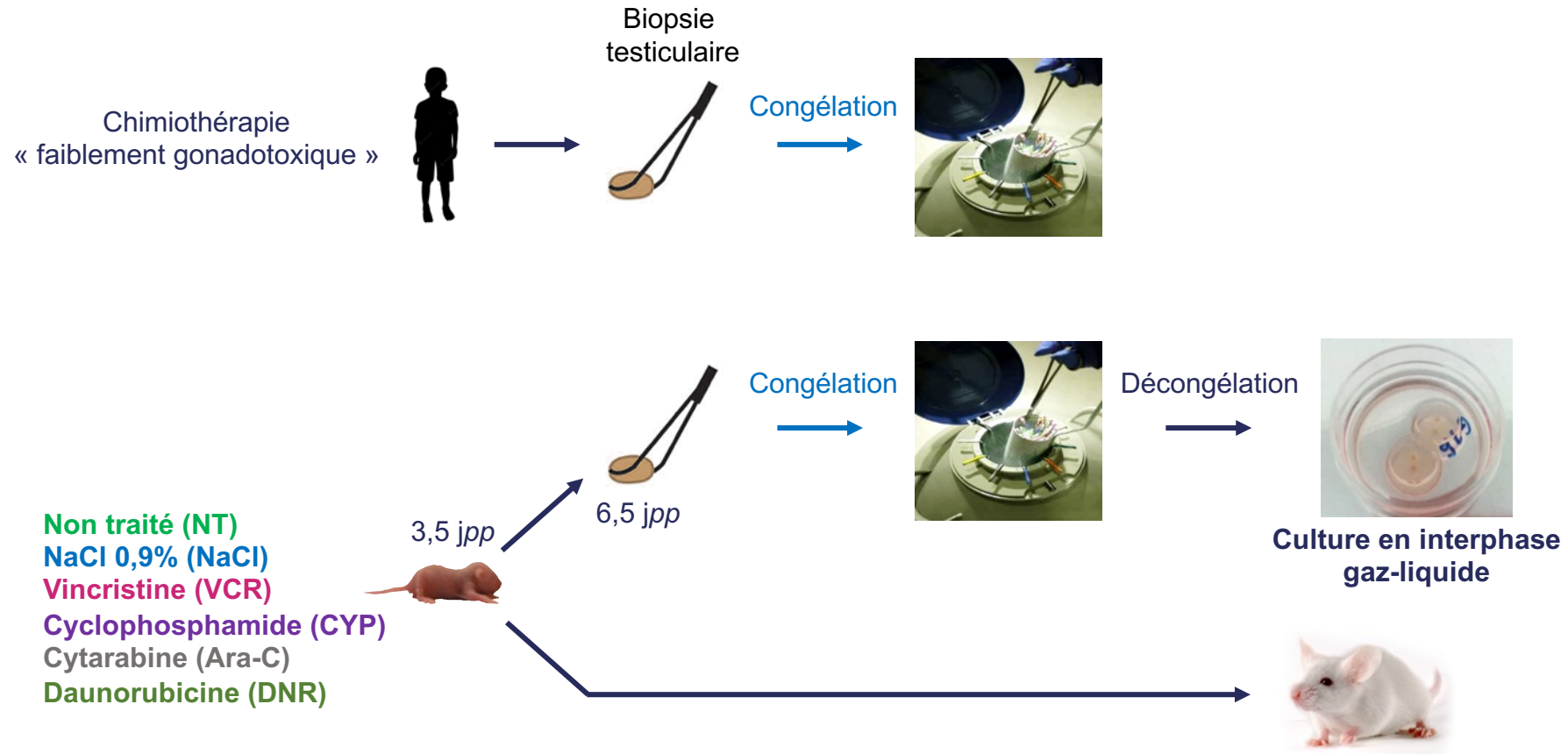
Culture de tissu testiculaire de souris



CLC : congélation lente contrôlée
VSS : vitrification sur surface solide

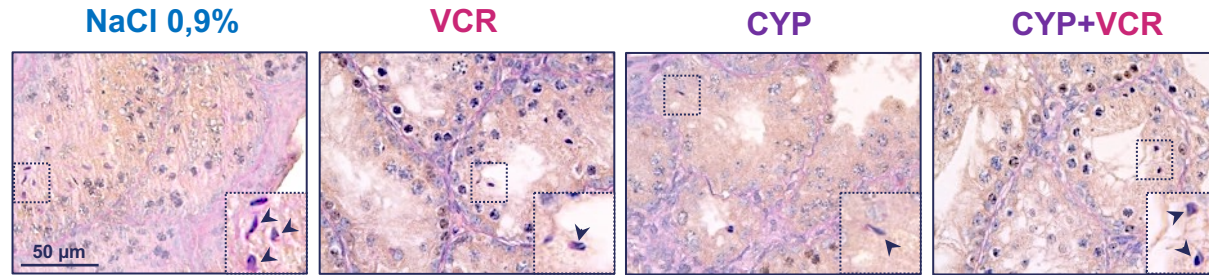
Dumont *et al.*, 2015

Impact de la chimiothérapie sur la spermatogenèse *in vitro*



- Dommages tissulaires ?
- Capacité des spermatogonies à se différencier ?

Impact de la vincristine et du cyclophosphamide sur la spermatogenèse *in vitro*



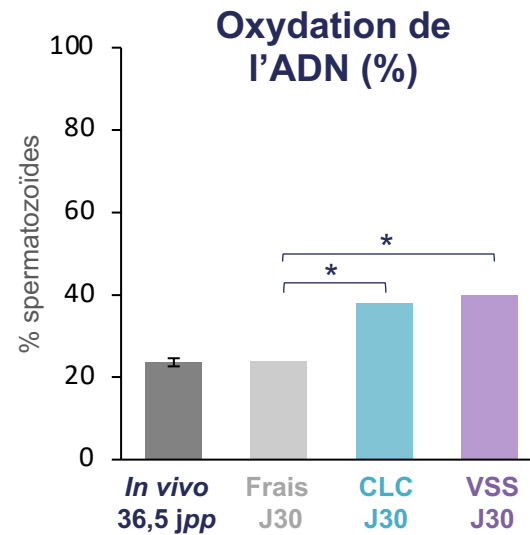
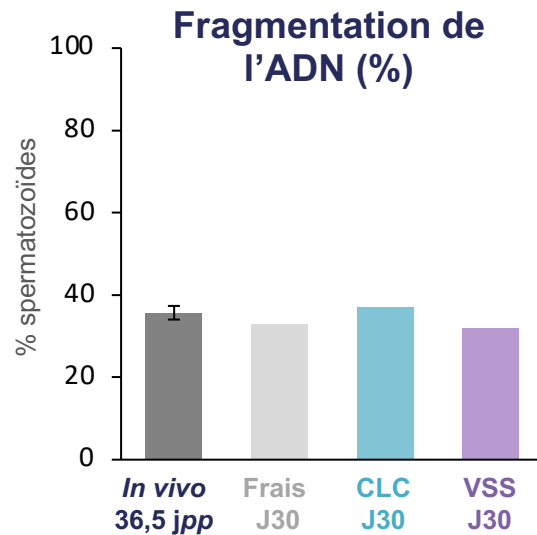
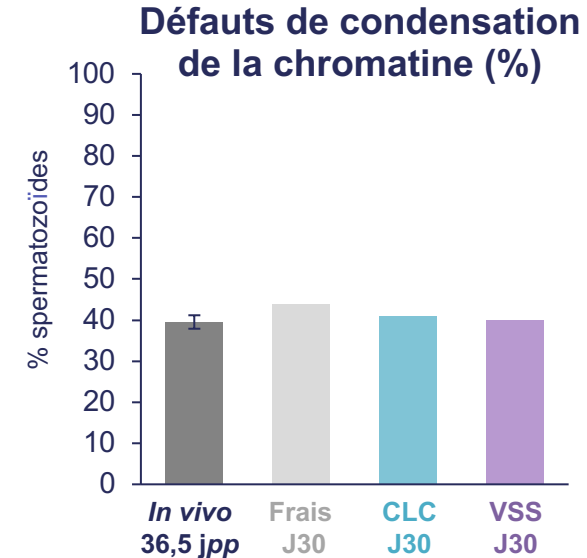
	% tubes au stade de différenciation le plus avancé			
	NaCl 0,9%	VCR	CYP	VCR+CYP
Aucune cellule germinale (Sertoli cell-only)	0	1,7 ± 1,7	0	1,7 ± 1,0
Spermatogonies	0	5,0 ± 3,2	0	5,0 ± 2,1
Spermatocytes leptotène/zygotène	5,0 ± 2,9	10,8 ± 4,6	9,2 ± 0,8	5,0 ± 1,7
Spermatocytes pachytène	38,3 ± 4,0	44,2 ± 5,8	36,7 ± 0,0	45,0 ± 4,8
Spermatides rondes	29,2 ± 2,5	20,8 ± 6,4	29,2 ± 2,8	22,5 ± 6,4
Spermatides allongées	27,5 ± 2,8	17,5 ± 2,5	25,0 ± 2,8	20,8 ± 13,1

VCR / CYP / CYP+VCR : spermatogenèse *in vitro* complète

Delessard *et al.*, 2022

Qualité nucléaire des spermatozoïdes produits *in vitro*

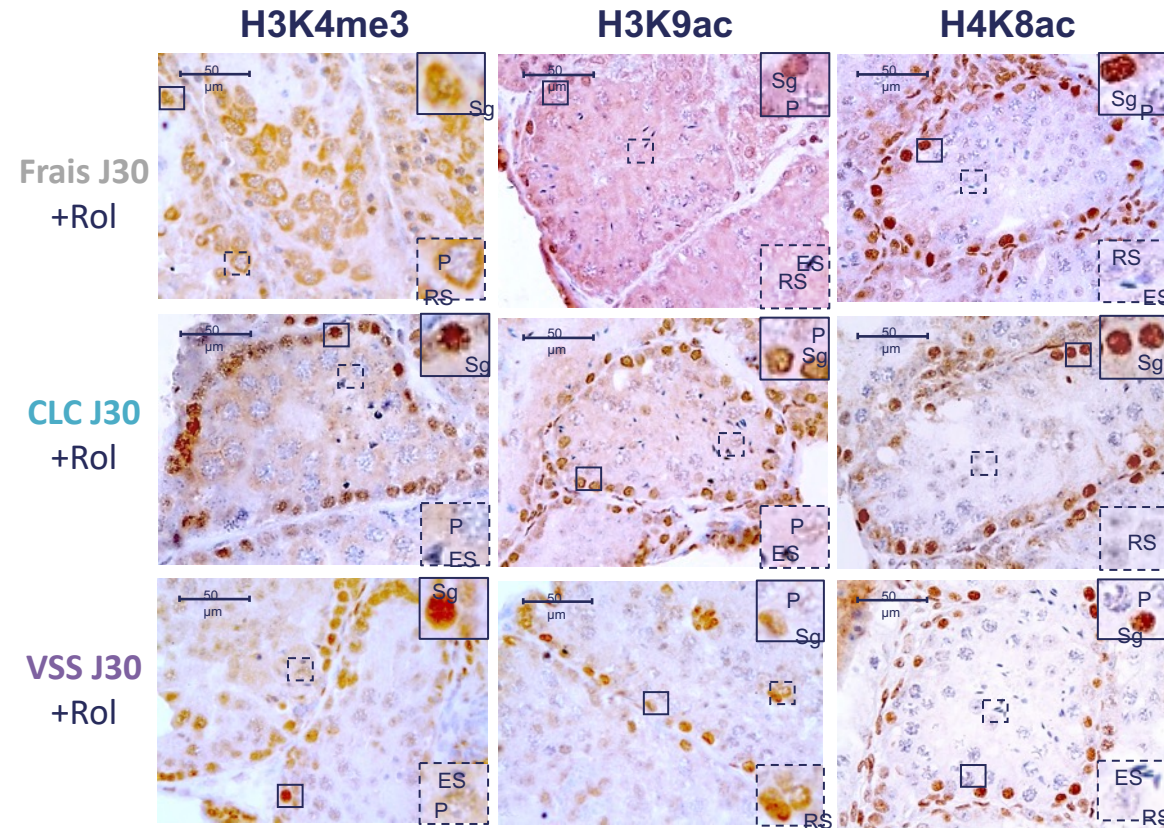
	Haploïdie (%)	Ratio X8/Y8	Aneuploïdie (%)	Diploïdie (%)	Anomalies chromosomiques (%)
In vivo 36,5 jpp	91,45 ± 1,50	1,06 ± 0,09	5,79 ± 0,80	0,15 ± 0,15	5,95 ± 0,84
Frais J30	94,06	1,11	3,96	0	3,96
CLC J30	92,16	1,24	3,92	0	3,92
VSS J30	93,46	1,22	3,74	0	3,74



- Majorité de spermatozoïdes
 - haploïdes
 - chromatine condensée
 - ADN non fragmenté
 - ADN non oxydé
- ↑ % de spermatozoïdes 8-OHdG+ dans les tissus décongelés

Oblette *et al.*, 2017

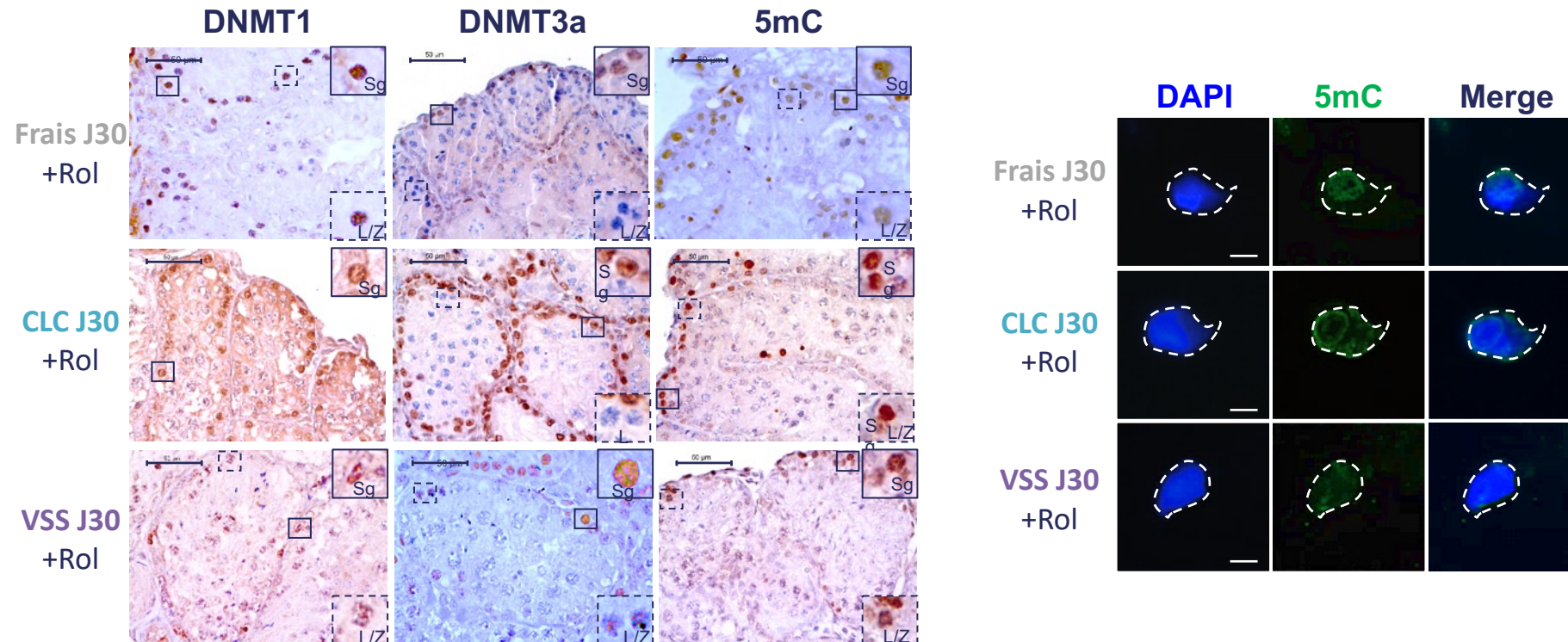
Modifications épigénétiques dans la lignée germinale : modifications post-traductionnelles des histones



- Expression de gènes codant des enzymes de modification des histones
- Présence des histones H3K4me3, H3K9ac et H4K8ac

Oblette *et al.*, 2019

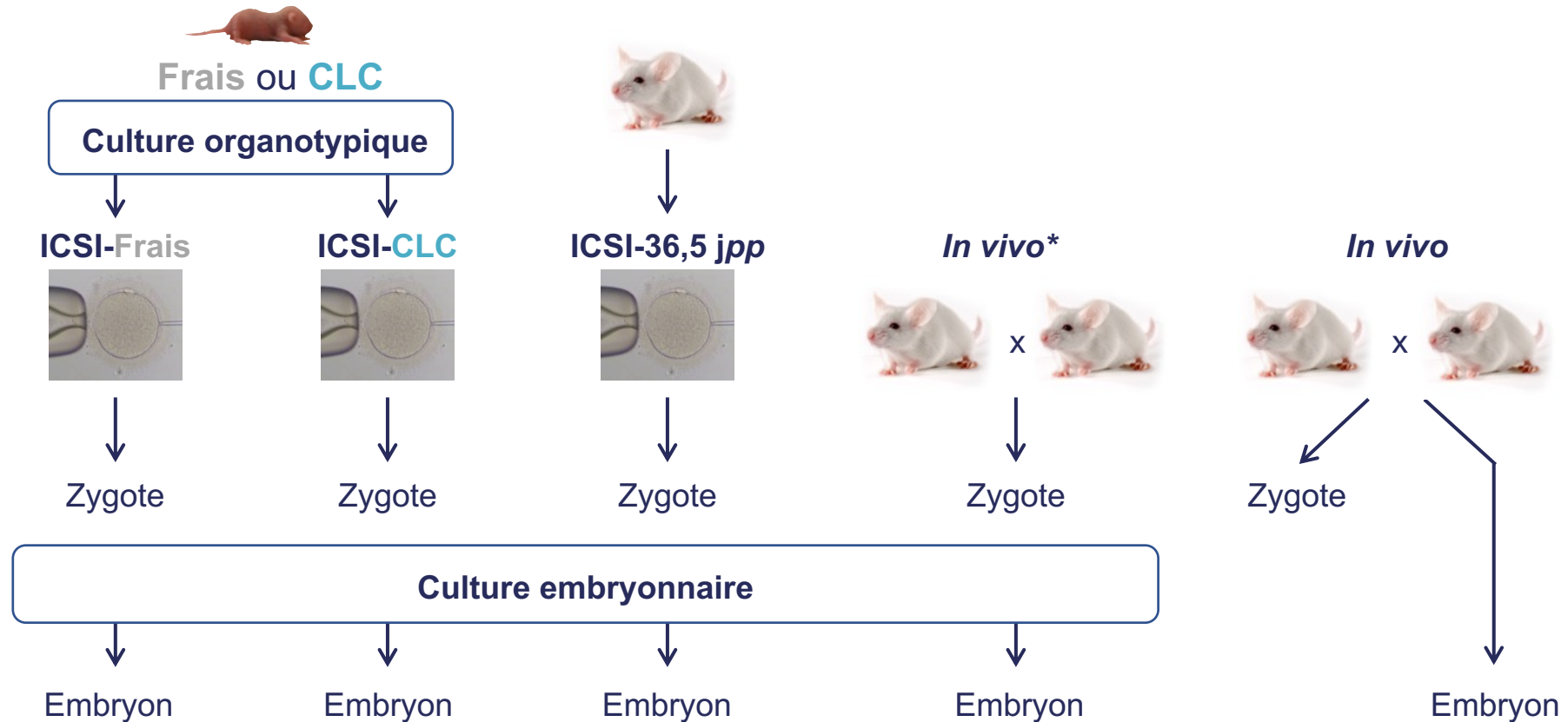
Modifications épigénétiques dans la lignée germinale : méthylation de l'ADN



- Expression des ADN méthyltransférases DNMT1 et DNMT3a
- Présence de la marque épigénétique 5mC (5-méthylcytosine)

Oblette *et al.*, 2019

Développement embryonnaire après ICSI



Immunofluorescence : 5mC, 5hmC, H3K4me3, H3K27me3, H3K9ac

Oblette *et al.*, 2021

Développement embryonnaire après ICSI

	Taux de fécondation (%)	Taux de clivage (%)	Embryons 4 cellules (%)	Morula (%)	Blastocystes (%)	Taux de blastulation (%)
<i>In vivo</i> *	-	91,5 ± 4,9	97,2 ± 1,8	91,9 ± 4,1	79,7 ± 9,6	61,5 ± 11,2
ICSI <i>In vivo</i>	49,9 ± 3,4	79,6 ± 5,2	64,0 ^a ± 8,6	65,7 ^a ± 11,9	66,9 ± 10,4	24,4 ^a ± 6,7
ICSI Frais	46,4 ± 3,0	76,1 ± 3,9	68,1 ^a ± 6,5	68,2 ^a ± 7,7	60,1 ± 11,6	15,9 ^a ± 4,3
ICSI CLC	37,9 ^b ± 4,5	76,0 ± 6,8	63,3 ^a ± 9,9	n.d.	n.d.	n.d.

a : $P < 0,05$ comparé à *In vivo**

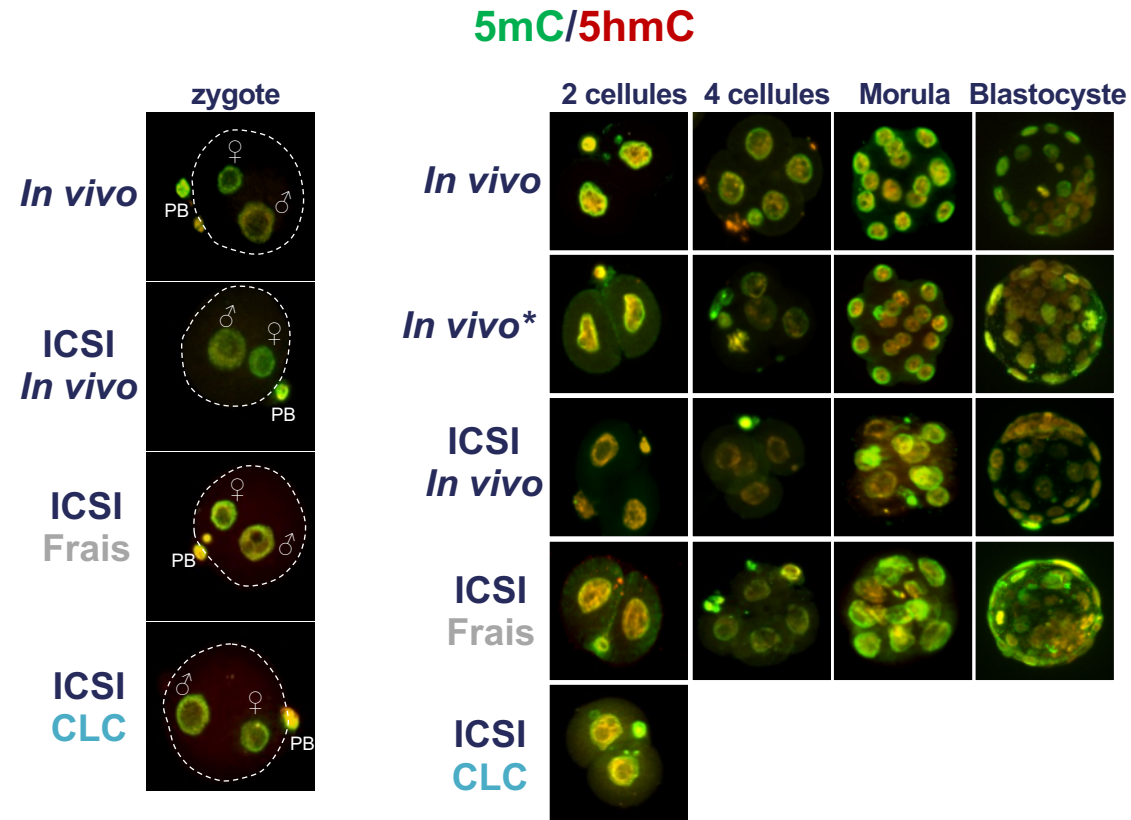
b : $P < 0,05$ comparé à ICSI *In vivo*

n.d.: non déterminé

ICSI CLC : ↓ taux de fécondation

Oblette *et al.*, 2021

Modifications épigénétiques dans les embryons issus d'ICSI

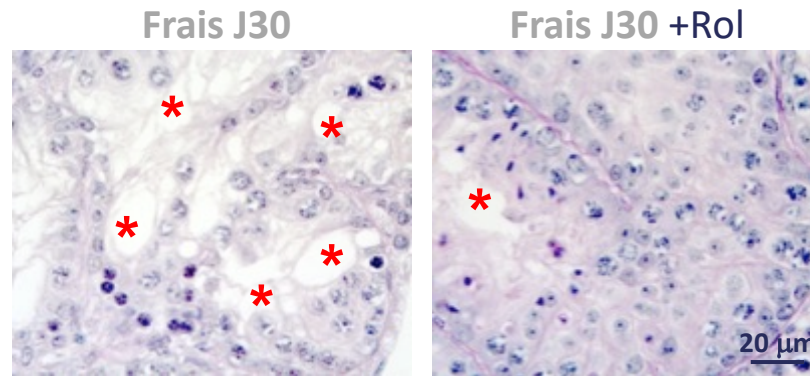


- Impact sur la méthylation et déméthylation de l'ADN au cours du développement embryonnaire précoce
- Aucun impact sur les histones H3K4me3, H3K27me3 et H3K9ac

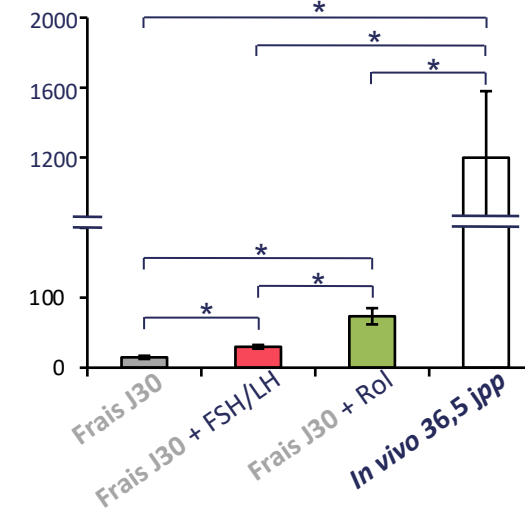
Oblette *et al.*, 2021

Culture organotypique : suppléments des milieux de culture

- Vitamine A (Arkoun *et al.*, 2015 ; Dumont *et al.*, 2016)



Nombre moyen de spermatozoïdes
par mg de tissu

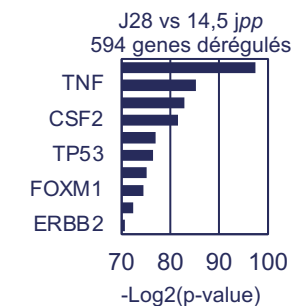
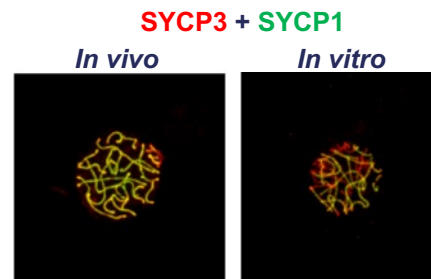
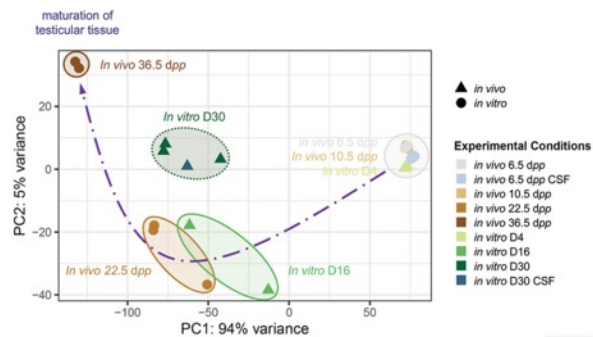
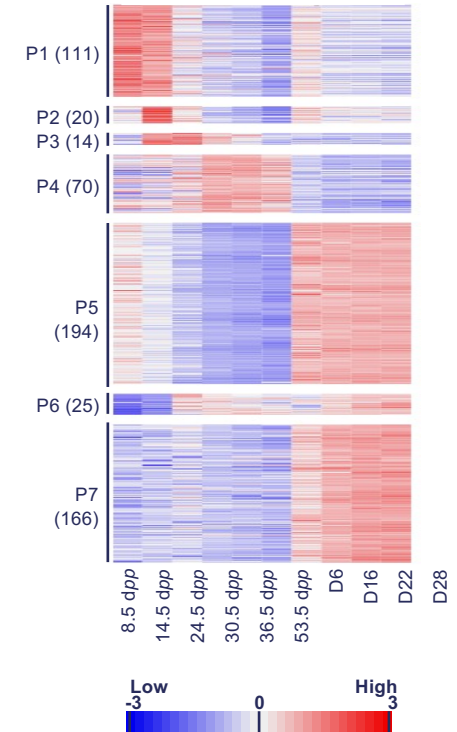


- Vitamine E (Arkoun *et al.*, 2019)
- KSR vs Albumax ± agitation constante (Nakamura *et al.*, 2017)
- Mélatonine ± Glutamax (Reda *et al.*, 2017)
- Acide rétinoïque, FSH, LH, T3, testostérone (Arkoun *et al.*, 2015 ; Sanjo *et al.*, 2018, 2020)

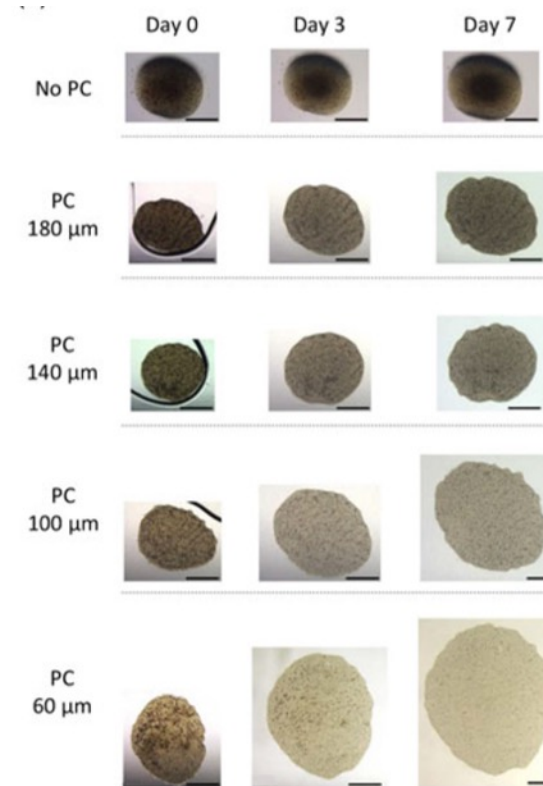
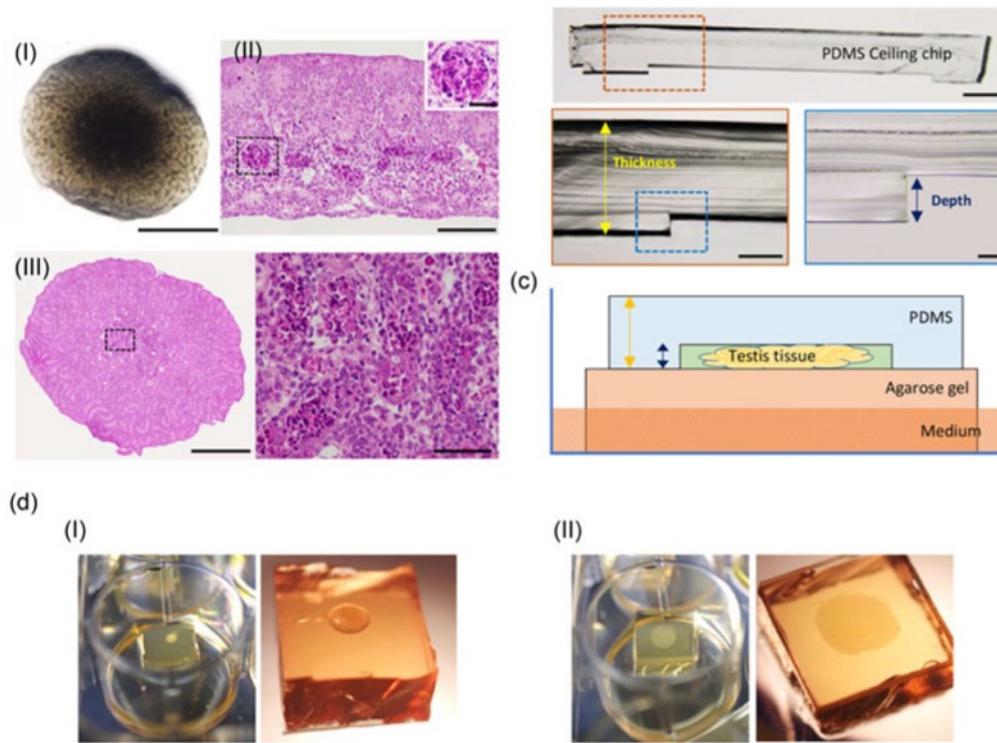
Analyses transcriptomiques des tissus maturés *in vitro*

Profil transcriptomique différent des tissus maturés *in vivo*

- Diminution de l'expression d'*Igf-1* (Yao *et al.*, 2017)
- Altération de la progression méiotique (Abe *et al.*, 2020 ; Saulnier *et al.*, 2022 ; Dumont *et al.*, 2023)
- Anomalie de formation du complexe synaptonémal (Saulnier *et al.*, 2022)
- Réaction inflammatoire (Abe *et al.*, 2020 ; Suzuki *et al.*, 2021 ; Saulnier *et al.*, 2022; Dumont *et al.*, 2023)
- Altération de la stéroïdogénèse (Saulnier *et al.*, 2022 ; Dumont *et al.*, 2023)



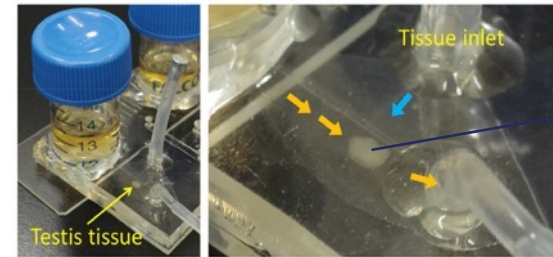
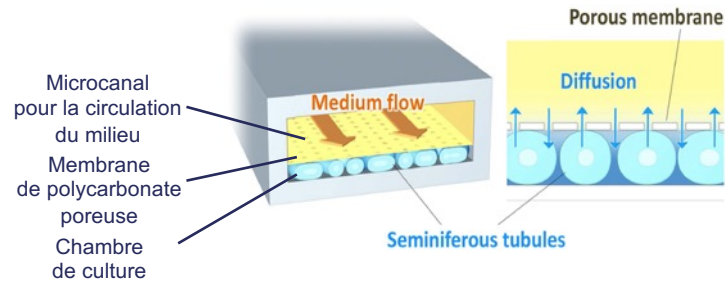
Modification du système de culture organotypique



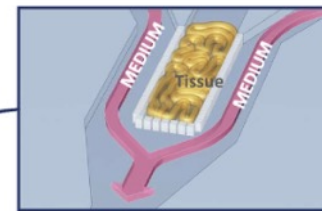
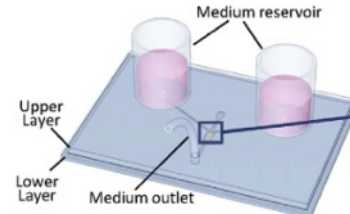
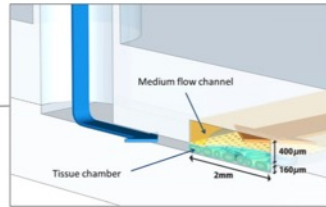
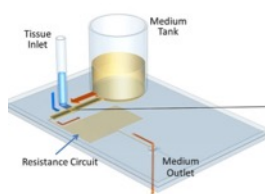
- Meilleure diffusion de l'oxygène et des nutriments
- Absence de zone nécrotique centrale
- Croissance tissulaire
- Meilleur rendement de la spermatogenèse *in vitro* chez la souris

Kojima *et al.*, 2018
Komeya *et al.*, 2019

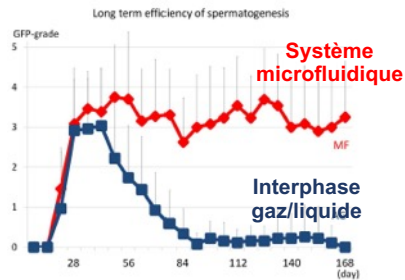
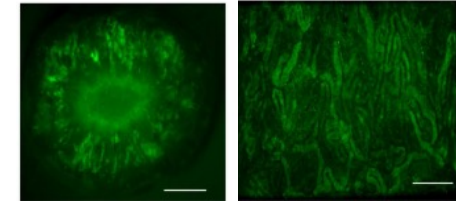
Systemes de culture microfluidique



Tissu testiculaire de souris prépubère



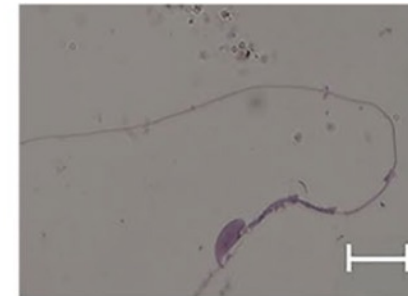
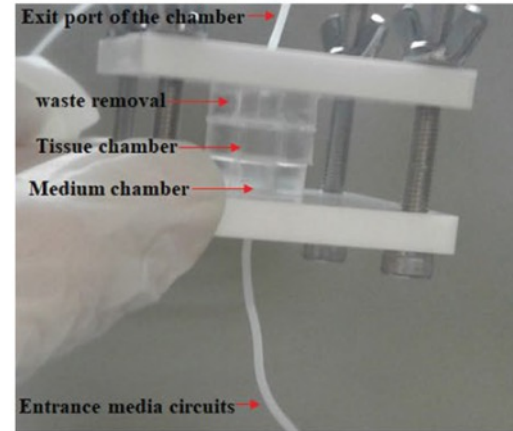
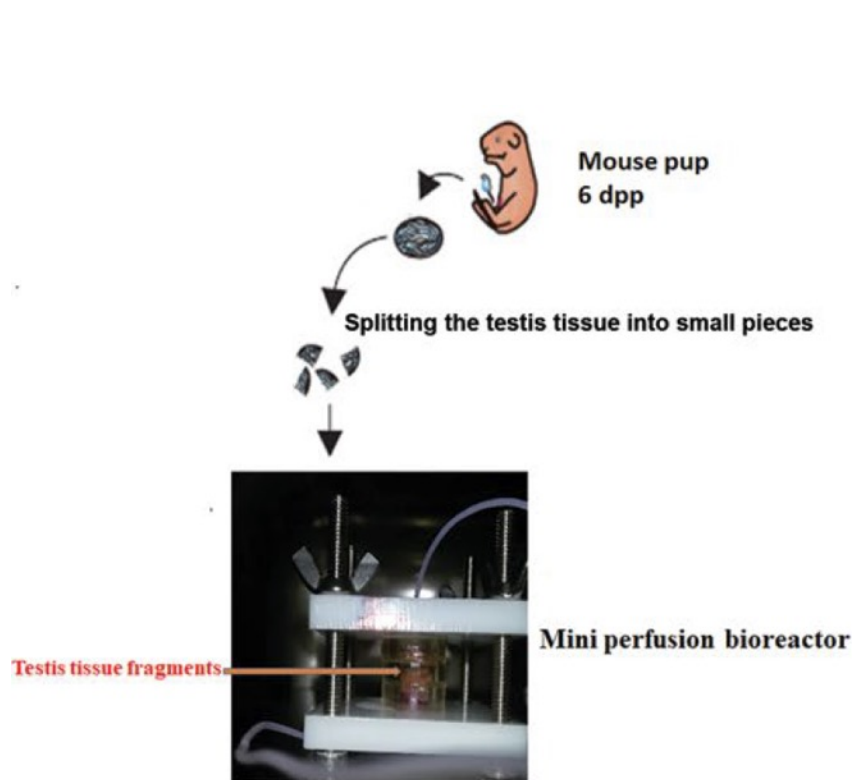
Interphase gaz-liquide Systeme microfluidique



- Absence de zone nécrotique centrale
- Maintien de la spermatogenèse pendant 6 mois
- Descendance viable et fertile

Komeya *et al.*, 2016
Komeya *et al.*, 2017
Yamanaka *et al.*, 2018

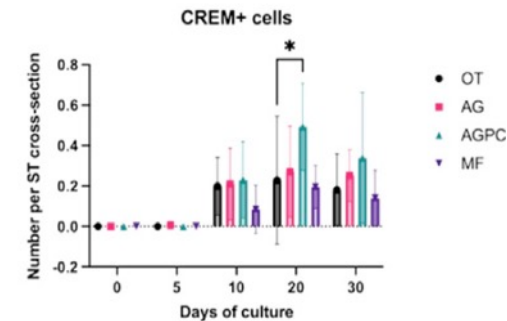
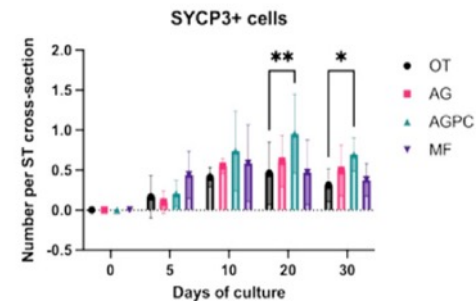
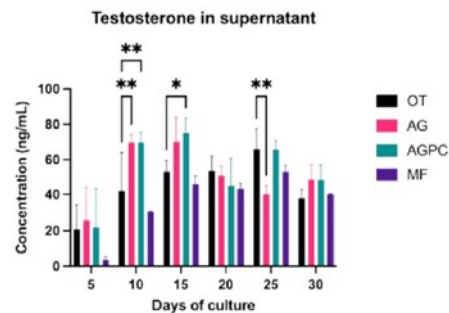
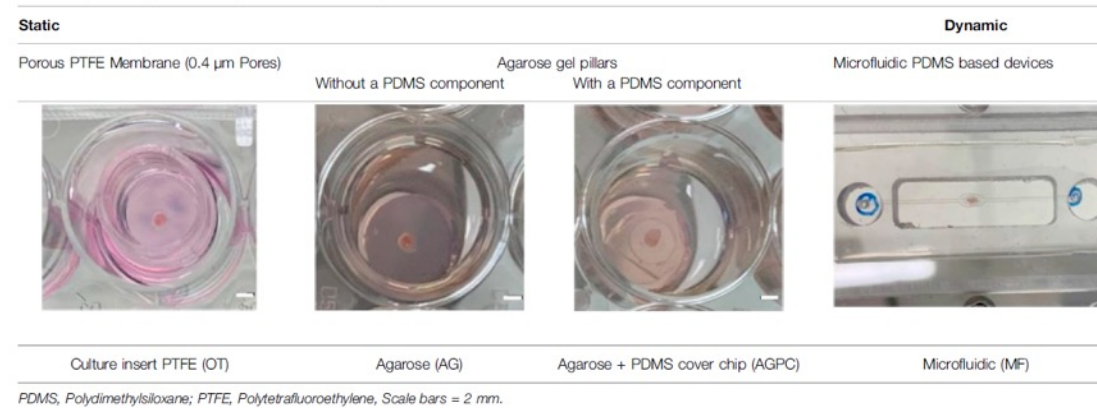
Système de culture en bioréacteur à perfusion



- Production de « sperm-like cells »
- Maintien de la spermatogenèse *in vitro* pendant 8 semaines

Amirkhani *et al.*, 2022

Comparaison de différents systèmes de culture



Culture de tissu testiculaire de porcs prépubères :

Après 30 jours

- Fonctionnalité des cellules de Leydig
- Production de cellules méiotiques et post-méiotiques
- Meilleur rendement de la spermatogenèse *in vitro* avec une plaque de PDMS

Kambar *et al.*, 2022

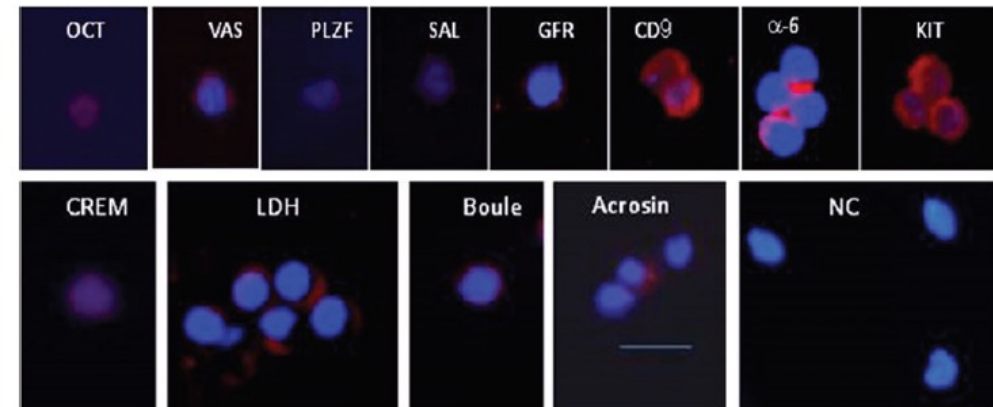
Culture 3D de cellules testiculaires de garçons prépubères

MCS : Methylcellulose Culture System

Table 1. Summary of clinical data relate to prepubertal patient boys.

Patient #	Age (Y)	Diagnosis	Treatment history and accumulative dosage	Duration of chemo treatment	Time lapse between last chemo and surgery	Johnsen's score	Tanner stage
1	6	Acute Promyelocytic Leukaemia (APML)	Chemotherapy + ATRA [Etoposide,450 mg; Idarubicin, 61 mg; Mitoxantrone, 20 mg; Cytosar (3 months), 13400 mg; ATRA] 3 years), Cytozar ([T])	3M	5Y	ND	I
2	6	Acute lymphoblastic leukemia (ALL)	Chemotherapy (BFM ALL 2009 protocol) [Frdnizon/Dexcorate (4 months), Vincristin (3 months), 15.1 mg; Daunotubicin (3 months), 188.9 mg; Aspargenase, 6297.2 mg; Cyclophosphamide (3 months), 5 g; Ephosphomide, 5 g; Cytozar (3 months), 13400 mg; Methotrexate, 12.5 g; Etoposide, 200.2 mg]	4M	1M	4	I
3	7	Acute lymphoblastic leukemia (ALL)	Chemotherapy (BFM ALL 2009 protocol) (Daunorubicin, 60 mg; Vincristin, 12 mg; Ducsorubicin, 120 mg; Methotrixane, 20 g; Cyclophosphamide, 3 g; L-Asparginz, 120000 Units; Cytozar, 1800 mg; Lanbi, 840 mg; Purinetol, 3080 mg; Ferdnizon, 1800 mg; Dexamrthasone, 236 mg)	30M	1M	4	I
4	10	Acute lymphoblastic leukemia (ALL)	Chemotherapy (BFM ALL 2009 protocol) (Deonorubicin (6 months), 240 mg; Eidrubicine, 24 mg; Cyclophosphamide (6 months), 4 g; Vincristine (7 months), 20.5 mg; Cytarabine (20 months), 8400 mg; Peg-Aspargenase (7 months), 5000 Units; Arabinase, 200000 Units; Methotrixate (3 months), 21000 mg; Parddenizane (7 months)	31M	1M	ND	II
5	13	Acute lymphoblastic leukemia (ALL)	Chemotherapy (BFM ALL 2009 protocol) (Prednisone, 2340 mg; Vincristine, 15.6 mg; Daunorubicine, 156 mg; L-Asparginase, 156000 Units; Cycophosphamide, 3.9 g; Cytarabine, 2340 mg; Mercaptopurine, 39650 mg; Methotrexate IV, 26 g; Methotrexate PO, 2184 mg; Dexamethasone, 325 mg; Doxorubicine, 156 mg; Thioguanine, 1092 mg)	29M	1M	ND	III-IV
6	6	Medulloblastoma (MD)	Chemotherapy (Vincristine), Cranial-Spinal Radiation (Gy 23.4), Vincristine, 1.5 mg.	Once	2M	5	I
7	9	Rhabdomyosarcoma (recurrent)	Chemotherapy, Radiation (Vincristine, 1.5 mg; Actinomycin, 15 µg; Cytoxan (all for 8 months), 25 mg; VP16, 500 mg; Ifosamide, 10 g; Doxorubicin) and auto stem cell transplantation (Thiotepa, 720 mg; melphalan, 180 mg; Carboplatin, 2 g).	10M	8M	ND	I
8	7	Beta-Thalassemia Major (THA)	None	None	None	ND	I

Après 15 semaines



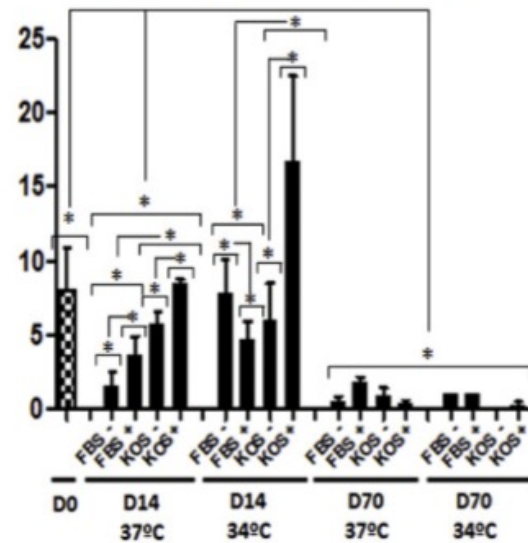
Expression de marqueurs méiotique et post-méiotique

Abofoul-Azab *et al.*, 2018

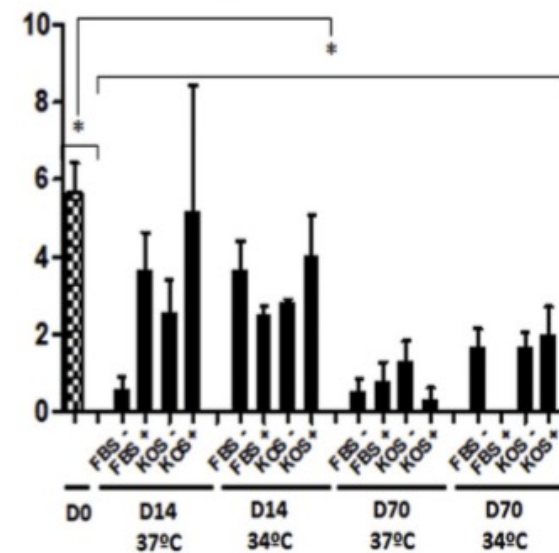
Culture de tissu testiculaire de garçons prépubères

Après 14 et 70 jours

No. of UTF1+ cells per tubule cross-section



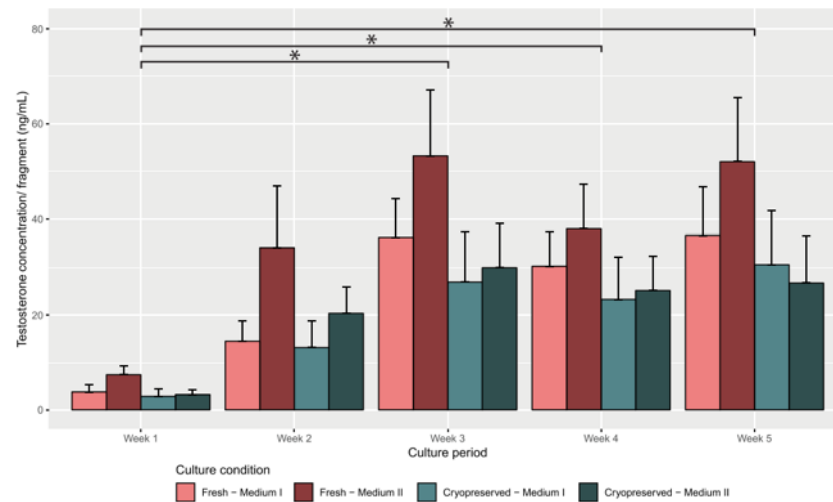
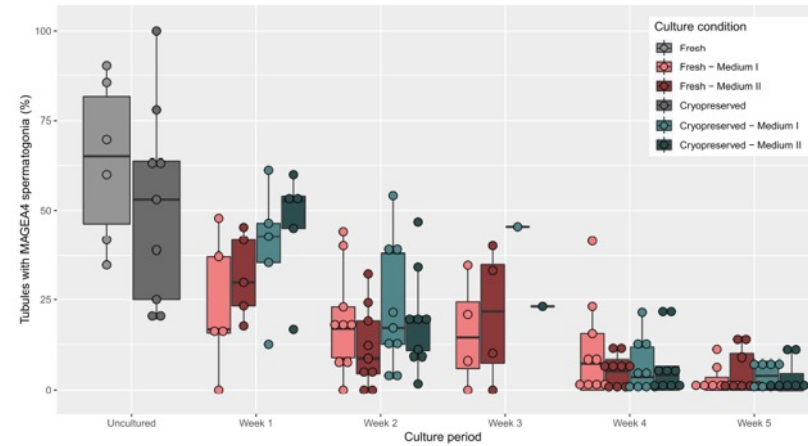
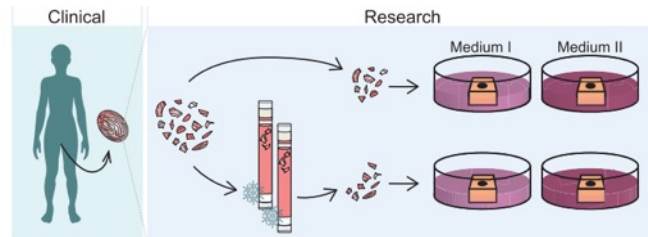
No. of c-KIT+ cells per tubule cross-section



Survie des spermatogonies

Medrano *et al.*, 2018

Culture de tissu testiculaire de garçons prépubères

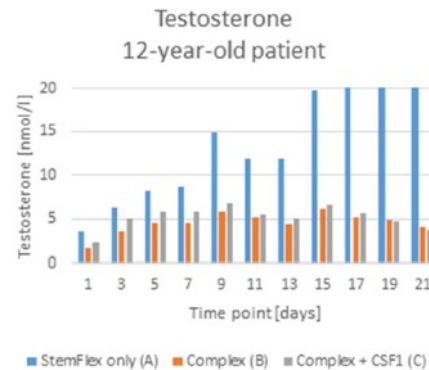
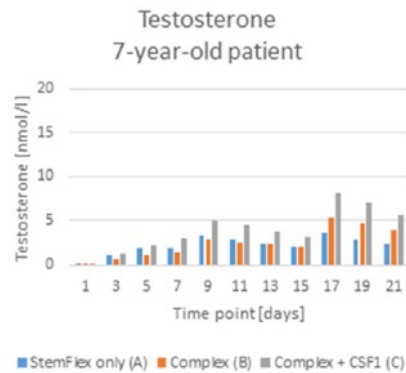
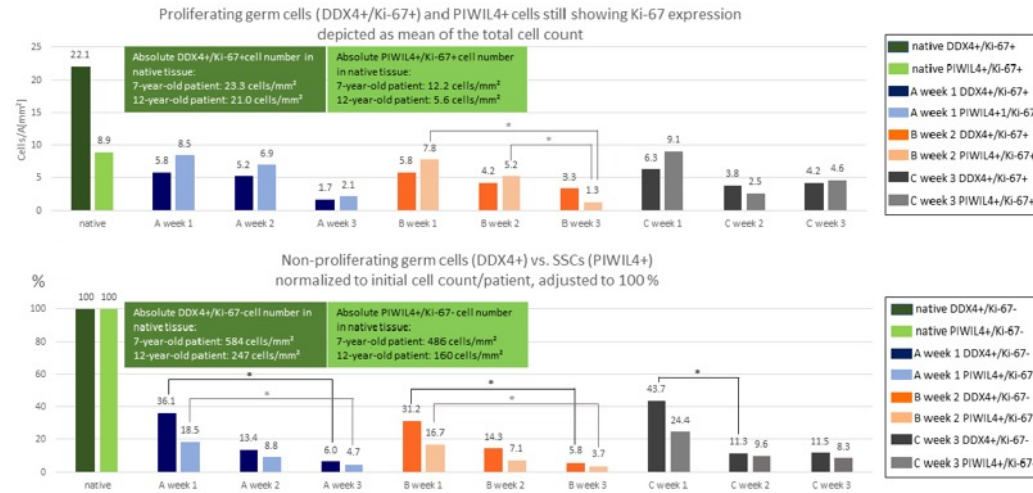


Après 5 semaines

Survie des spermatogonies
Fonctionnalité des cellules de Leydig

Portela *et al.*, 2019

Culture de tissu testiculaire de garçons prépubères

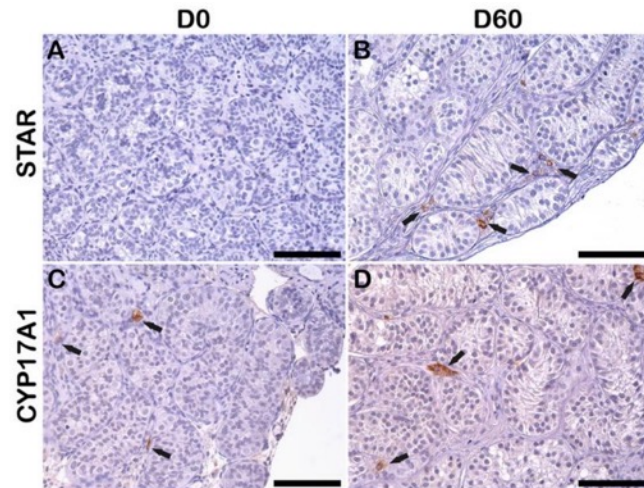
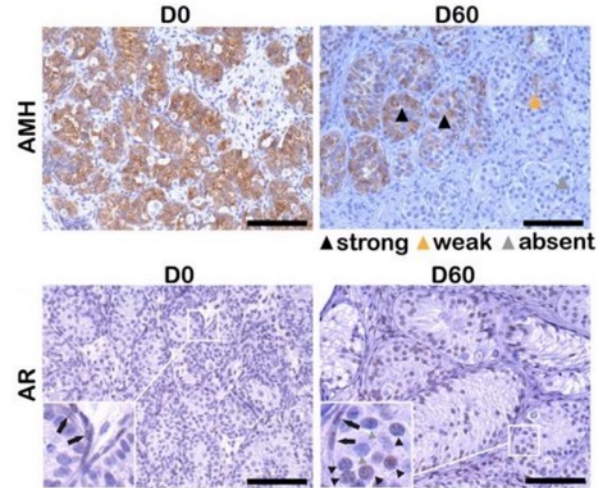
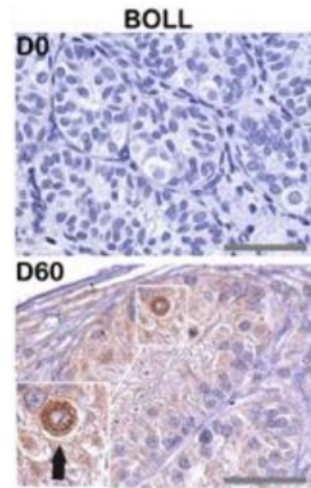


Après 3 semaines

Survie des spermatogonies
Fonctionnalité des cellules de Leydig

Aden *et al.*, 2023

Culture de tissu testiculaire de garçons prépubères

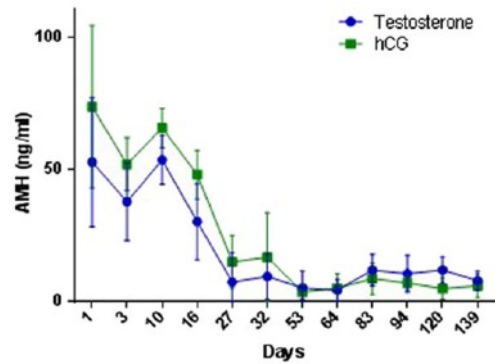
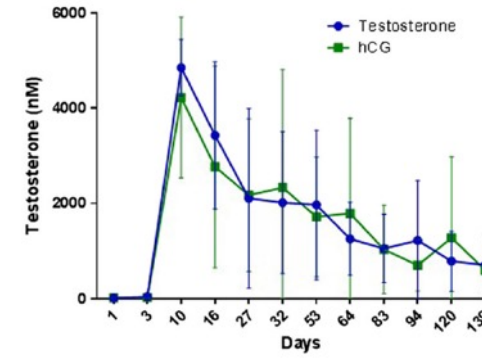
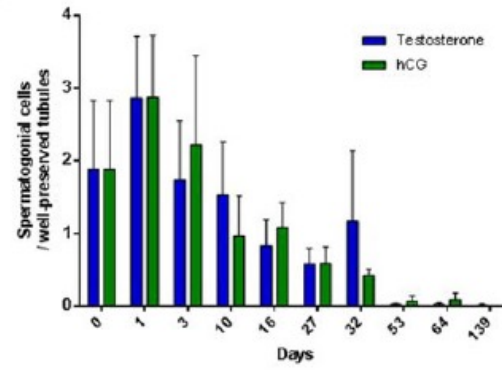
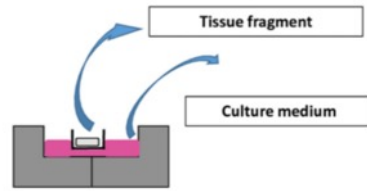


Après 8 semaines

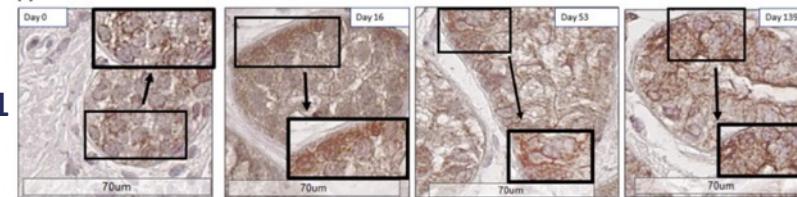
Production de spermatoocytes
Maturation des cellules de Sertoli
Fonctionnalité des cellules de Leydig

Wang *et al.*, 2022

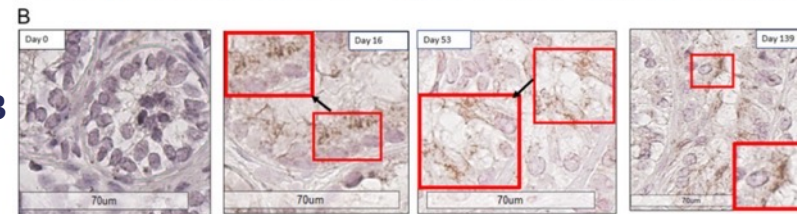
Culture sur inserts de tissu testiculaire de garçons prépubères



CLDN11



Cx43

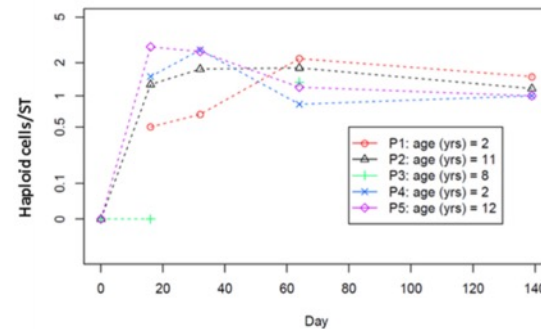
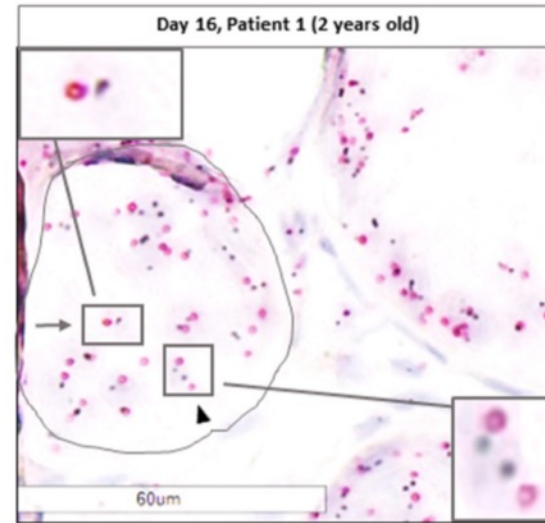
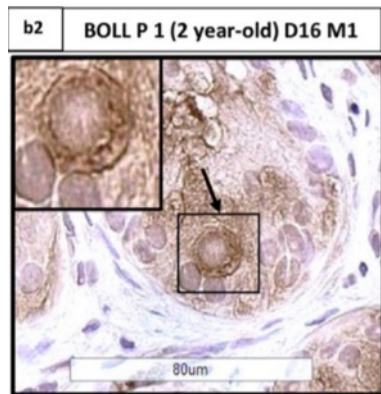
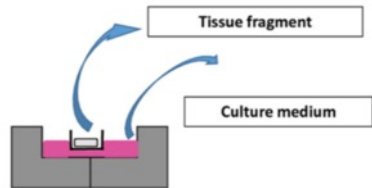


Après 139 jours

- Préservation de l'intégrité des tubes séminifères
- Survie des spermatogonies
- Maturation des cellules de Sertoli et de Leydig
- Mise en place de la barrière hémato-testiculaire

de Michele *et al.*, 2017, 2018

Culture sur inserts de tissu testiculaire de garçons prépubères



- Production de cellules méiotiques et post-méiotiques après 16 jours de culture
- Production de cellules haploïdes

de Michele *et al.*, 2018

Obstacles - Défis à relever

• Protocoles à optimiser

- Se rapprocher des conditions physiologiques
- Augmenter le rendement de la spermatogenèse *in vitro* dans les modèles animaux



- Meilleure connaissance des mécanismes moléculaires
- Supplémentation des milieux de culture
- Amélioration des systèmes de culture

• Application humaine

Réussir à générer des spermatozoïdes humains *in vitro*



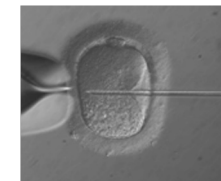
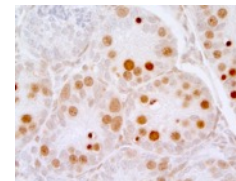
- Meilleure connaissance des mécanismes moléculaires
- Adaptation du protocole à l'âge du patient

• Mesures de sécurité et préoccupations éthiques

- Sécurité de la procédure
- Qualité des spermatozoïdes
- Descendance dans les modèles animaux : effets inter/transgénérationnels ?
- Génération d'embryons humains à partir de spermatozoïdes produits *in vitro*



- Protocole exempt de xéno-contaminants
- Génome et épigénome des spermatozoïdes et de la descendance
- Développement et santé de la descendance



Merci de votre attention

Pr Nathalie Rives
Dr Ludovic Dumont
Dr Magali Basille-Dugay
Dr Aurélie Feraille
Dr Marion Delessard
Dr Fanny Jumeau
Dr François Fraissinet
Laura Moutard
Frédérique Bateux
Louise Huber

Pr Bertrand Macé
Dr Jean-Pierre Milazzo
Dr Albanne Travers
Dr Brahim Arkoun
Dr Antoine Oblette
Dr Justine Saulnier
Dr Ahmed Maouche
Dr Julie Rondeaux
Dr France Verhaeghe
Dr Benoît Berby

Amandine Bironneau
Donovan Liot
Véronique Duchesne
Agathe Way
Laura Stalin
Mathilde Soirey

