

Rapport scientifique 2018

Bourse « Sacha » France Lymphome Espoir 2016

Titre du projet : Amélioration de la qualité de vie des garçons traités pour un lymphome : étude dans un modèle murin de la restauration de la fertilité à partir de tissu testiculaire congelé et de la qualité des spermatozoïdes générés *in vitro*

Les objectifs de ce projet de recherche ont été d'évaluer pour la première fois dans un modèle animal la qualité nucléaire des spermatozoïdes générés *in vitro*, leur capacité fécondante et à assurer un développement embryonnaire normal.

Résultats obtenus

▪ Qualité des noyaux des spermatozoïdes murins générés *in vitro*

Nous avons montré que la qualité nucléaire des spermatozoïdes produits *in vitro* est comparable à celle observée *in vivo* dans les conditions physiologiques : la plupart des spermatozoïdes produits dans les cultures de tissus testiculaires congelés (après congélation lente contrôlée ou vitrification) sont haploïdes, contiennent un ADN non fragmenté, non oxydé, et une chromatine compactée. La longueur des télomères dans les gamètes générés *in vitro* n'est pas significativement différente de celle estimée dans les spermatozoïdes produits *in vivo*. La méthylation de l'ADN (modification épigénétique transmissible à la descendance et jouant un rôle important au cours du développement embryonnaire) a lieu dans les cellules germinales maturées *in vitro*. L'expression des ADN méthyltransférases DNMT1 et DNMT3a et la marque épigénétique 5-mC (5-méthylcytosine) sont détectées dans les cultures de tissus congelés et dans les contrôles *in vivo*. De plus, les niveaux de 5-mC sont similaires dans le noyau des spermatozoïdes produits *in vitro* ou *in vivo*.

Cinq communications affichées et quatre communications orales portant sur ces travaux ont été présentées dans des congrès locaux, nationaux ou européens en 2017. Le prix Jeune chercheur 2017 de la Fédération des BLEFCO et le prix Poster 2017 de la Fédération française des CECOS ont été décernés à Antoine Oblette. Un article scientifique a été publié en 2017 dans *Molecular Human Reproduction*. Un deuxième article a été récemment soumis à *Reproductive Biomedicine Online*.

▪ Capacité fécondante des gamètes produits et développement embryonnaire

Les spermatozoïdes obtenus *in vitro* sont capables de féconder des ovocytes après microinjection ovocytaire (ICSI). Des embryons pré-implantatoires (zygote, stade 2 cellules, stade 4 cellules, morula, blastocyste) ont été obtenus. Un taux de fécondation moyen de 36% et 45% et un taux de développement embryonnaire jusqu'au stade 2 cellules de 73% et 76% ont été obtenus pour les ICSI réalisées respectivement à partir de spermatozoïdes issus de cultures de tissus congelés et à partir de spermatozoïdes testiculaires extraits des contrôles *in vivo*. Les modifications épigénétiques (méthylation/hydroxyméthylation de l'ADN, modifications post-traductionnelles des histones) ont été analysées dans les embryons obtenus. Les niveaux de méthylation et d'hydroxyméthylation de l'ADN (5-mC et 5-hmC) sont comparables dans les embryons à 2 cellules obtenus à partir de spermatozoïdes générés *in vitro* ou *in vivo*. Des taux d'histones modifiées H3K27me3 et H3K9ac similaires sont retrouvés dans les embryons issus de spermatozoïdes produits *in vitro* ou *in vivo*. Les taux d'histones H3K4me3 sont en revanche augmentés dans les embryons à 2 cellules obtenus à partir de gamètes produits *in vitro*. Les résultats obtenus avec les embryons aux stades 4 cellules, morula et blastocyste sont en cours d'analyse. Des tentatives de transfert d'embryons dans les oviductes de femelles pseudo-gestantes ont été réalisées. Cette procédure reste toutefois à optimiser avant de pouvoir envisager l'étude de la santé, la survie, le comportement et la fertilité de la descendance.

Quatre communications affichées et une communication orale ont été présentées dans des congrès locaux, nationaux ou européens en 2018. Un article scientifique est en cours de rédaction.

Grâce à la subvention accordée par France Lymphome Espoir, nous avons analysé la qualité et la fonctionnalité des gamètes produits *in vitro* et les embryons obtenus après ICSI. Les caractéristiques des spermatozoïdes générés *in vitro* et la qualité des embryons sont proches de celles observées dans les conditions physiologiques. Au vu des résultats encourageants obtenus, une application du protocole de maturation *in vitro* au tissu testiculaire de garçons atteints de lymphome pourrait être envisagée dans l'avenir.